

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Par: Lahreche Redouane & Bouhamida Amel

Thème

***Capacité de biodégradation du gasoil
par des bactéries autochtones isolées de
sols contaminés***

Soutenu publiquement le : 05/06/2017

Devant le jury :

M. BEN SEMAOUNE Youcef	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Président
M. BOURAS Nouredine	Professeur	Univ. Ghardaïa	Examineur
M^{me}HADDAD Soumia	Maître de conférences B	Univ. Ghardaïa	Examineur
M. BELGHIT Saïd	Maître de conférences B	Univ. Ghardaïa	Encadreur

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu de nous avoir aidé à réaliser cet ouvrage.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie université de Ghardaïa

Nous tenons à remercier vivement notre encadreur Monsieur BELGHIT Said, maitre de conférences, à l'université de Ghardaïa, d'avoir proposé ce thème et accepté de nous encadrer et pour les précieux conseils et orientations qu'il a su nous prodiguer, pour sa patience, sa disponibilité et ses encouragements.

Nous remercions vivement M. BEN SEMAOUNE Youcef Chef de département de biologie à l'université de Ghardaïa de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre mémoire.

Nous tenons à remercier vivement les membres du Jury de mémoire qui ont accepté d'évaluer notre travail: MBOURAS Noureddine professeur à l'université de Ghardaïa.

Mme HADDAD Soumia Maitre de conférences à l'université de Ghardaïa

Nos vifs remerciements vont, également, à tous les ingénieurs et les techniciens des laboratoires de biologie sans exception pour leur aide et disponibilité, surtout pour leurs gentilleses.

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents

A mes très chères grand-mères

A ma chère femme et mes adorables enfants

Mouad & Haroun

A mes frères et sœurs

*A mes étudiants de lycée de chahid bouameromar –
metlili*

Redouane

Dédicace

Avant tout, grâce à ALLAH que je suis arrivé là.

Je dédie ce modeste travail, tout d'abord :

à la lumière de ma vie, ma mère, qui m'a toujours aidée et soutenue par ses prières et sa tendresse. Qu'ALLAH me la grande et la protège, qui m'a fait tout possible pour moi.

à mon très cher père pour sa patience et le sacrifice qu'il a consenti à mon égard durant mes études.

à mes chers frères Brahim, Youssef et mes sœurs Karima, Soundous à toute ma famille sans exception

à mes amis :Nadjat, Nour-el-houda, Abd el malek

à mon binôme LAHRACHE Redouane et toute sa famille

à mon encadreur BELGHIT Saïd

Et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

A tous et toutes mes collègues de promotion 2016-2017 de master biochimie

Amel

Résumé

Les fluides de forage à base d'huile présentent un intérêt pratique et économique dans le forage pétrolier, mais aussi sont considérés une sérieuse source de pollution des sols et des aquifères de leur composition en hydrocarbures. La bioremédiation est un processus de dépollution biologique de ces sites dépend de la biodégradabilité intrinsèque du polluant par des bactéries hydrocarbonoclastes autochtones.

A ce titre, les objectifs de notre travail sont: isolement des souches bactériennes à partir des borbiers à base d'huile dans une zone de forage pétrolière dans la région de Ghardaïa, leur identifier biochimiquement, puis étudier les conditions de croissance (pH, température et concentration initial de gasoil) des bactéries sélectionnées.

Au cours de ce travail, nous avons isolé vingt isolats à partir des échantillons de sols contaminés, dont nous avons choisi morphologiquement treize d'entre eux. Parmi ces derniers huit montre une activité hydrocarbonoclaste. L'identification biochimique de ces isolats montre leur rapprochement aux genres suivants : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Brevibacterium*. Les huit isolats ont été testés pour leur production des biosurfactants, ainsi nous avons sélectionnés deux qui se sont avérés les meilleurs. Il s'agit de N18 (E24 42,28%) et N20 (E24 14,28). Les deux souches ont été étudiées pour l'optimisation des conditions de croissance à savoir: l'influence du pH, de la température et la tolérance au gasoil. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique, les résultats obtenus montrent que les deux souches possèdent un optimum de croissance au bout de 12 heures d'incubation. Les pH optimaux de croissance pour les deux souches N18 et N20 sont 12 et 10 respectivement. La meilleure température de croissance pour les deux souches est 30°C. La souche N18 a montré une grande tolérance au gasoil et sa croissance est meilleure à 20%. Tandis que la souche N20 sa croissance meilleure est à 10% de gasoil.

Mots clés : Bioremédiation, Gasoil, Bactéries autochtones, Sols contaminés.

قدرة التحليل البيولوجي للديزل من طرف بكتيريا أصلية معزولة من أتربة ملوثة

ملخص :

تعتبر سوائل الحفر الزيتية ذات أهمية عملية واقتصادية كبيرة في التنقيب عن النفط، لكنها تعتبر كذلك مصدرا خطيرا لتلوث التربة والمياه الجوفية هذا لما تحتويه من هيدروكربونات. إن المعالجة بالوسائط البيولوجية هي عملية إزالة التلوث بألية بيولوجية للمواقع الملوثة و تعتمد أساسا على تحلل الملوثات بالبكتيريا الأصلية في التربة والهاضمة للهيدروكربونات. نهدف من خلال عملنا هذا الى عزل سلالات بكتيرية من مستنقعات سوائل الحفر الزيتية بجوار آبار نفطية في منطقة غرداية، وتصنيفها مورفولوجيا و بيوكيميائيا، ثم دراسة الظروف المثلى لنموها (درجة الحموضة، ودرجة الحرارة والتركيز الأولي من زيت الديزل).

خلال هذا العمل، تمكنا من عزل عشرون سلالة بكتيرية من عينات من التربة الملوثة، اخترنا على أساس خصائص مورفولوجية ثلاثة عشر منها. ثمانية منها فقط أظهرت نشاط تحليل الهيدروكربونات. التصنيف البيوكيميائي لهذه العزلات أظهر قربها من الأجناس التالية: *Bacillus, Staphylococcus, Pseudomonas, Acinetobacter et Brevibacterium*.

تم اختبار إنتاج البيوسيرفاكتونات لهذه العزلات الثمانية، حيث اخترنا منها أفضل العزلات المنتجة و هما N18 (E₂₄ 42.28%) و N20 (E₂₄ 14.28%). تمت دراسة الظروف المثلى لنمو هتين السلالتين بتغيير درجة الحموضة ودرجة الحرارة و الكمية الابتدائية لوقود الديزل. تم قياس نمو البكتيريا عن طريق قياس شفافية الوسط، حيث أظهرت النتائج أن السلالتين لهما نمو أمثل بعد 12 ساعة من الحضنة. كما أن درجات الحموضة المثلى لأفضل نمو للسلالتين N18 و N20 هي على التوالي 12 و 10 وقد بينت النتائج كذلك أن درجة الحرارة المثلى هي 30 درجة مئوية لنمو السلالتين معا. كما أظهرت أن السلالة N18 تنمو بشكل أفضل وتحمل تركيز ابتدائي للوقود الديزل قدره 20%. في حين أن السلالة N20 أفضل نمو لها كان في التركيز الابتدائي للوقود الديزل 10%.

الكلمات المفتاحية :

المعالجة بالوساطة البيولوجية، وقود الديزل، البكتيريا الأصلية، أتربة ملوثة.

SOMMAIRE

	Page
Introduction.....	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I. Données sur les hydrocarbures	02
1. Définition.....	02
2. Origine des hydrocarbures.....	02
2.1. Les hydrocarbures fossiles.....	02
2.2. Les hydrocarbures actuels.....	02
2.3. Les rejets industriels et urbains.....	02
3. Classification.....	03
3.1. Hydrocarbures saturés.....	03
3.1.1. Alcanes linéaires.....	03
3.1.2 Alcanes ramifiés.....	04
3.1.3. Cycloalcanes.....	04
3.2. Hydrocarbures aromatiques.....	04
3.3. Composés polaires.....	04
3.4. Asphaltènes.....	04
II. Pollution des sols par les hydrocarbures	
1. Définition du sol.....	05
2. Compositions du sol.....	05
3. Forage pétrolier.....	05
3.1. Impact du forage sur l'environnement.....	06
3.2. Fluide de forage.....	06
3.2.1. La boue à base d'eau WBM (Water BasedMud).....	07
3.2.2. La boue à base d'huile OBM (OilBasedMud).....	08
3.2.3 La boue à base d'air ou de gaz.....	08
3. 3. Les bourbiers.....	08
III. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures	
1.1. Traitements physiques.....	09
2. Traitements chimiques.....	10
2.1. Oxydation chimique.....	10
3. Traitements biologiques.....	10
3.1. Bioremédiation.....	11

3.1.1. Méthodes de Bioremédiation	11
3.1.1.1. Bioaugmentation	12
3.1.1.2. Biostimulation	12
4. Bactéries dégradant les hydrocarbures	13
5. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures	14
5.1. Facteurs microbiens	14
5.2. Nutriments	15
5.3. Facteurs Physico–Chimique	15
5.3.1 Teneur en oxygène	15
5.3.2. L'aération	15
5.3.3. Activité de l'eau	15
5.3.4. Le pH	16
5.3.5. Température	16
5.3.6. Salinité	17
5.3.7. Potentiel Oxydation Réduction (Redox)	17
6. Les bio surfactants	17
6.1. Définition	17
6.2. Type des biosurfactants	18
6.3 Classification	18
6.4. Applications environnemental des biosurfactants	19

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Zone d'échantillonnage	20
2. Echantillonnage et prélèvement	20
3. Isolement	21
3. 1. Préparation des dilutions	21
3. 2. Ensemencement par étalement sur gélose nutritive	22
4. Purification	22
5. Conservation des souches purifiées	22
6. Isolement des souches susceptibles à dégrader le gasoil	22
7. Identification des souches purifiées	23
7. 1. Etude morphologique	23
7. 1. 1. Etude macromorphologique	23
7. 1. 2. Etude micro morphologique	23
7. 1. 2. 1. Etat frais	23
7. 1. 2. 2. Coloration de Gram	23
7. 1. 2. 4. Mobilité	23
7. 1. 2. 5. Recherche des spores	24

7. 2. Etude biochimique	24
7. 2. 1. Test de catalase	24
7. 2. 2. Test d'oxydase	24
7. 2. 3. Etude des types respiratoires	25
7. 3. Utilisation des galeries API	25
8. Sélection des souches productrice des bio surfactants	25
8. 1. Index d'émulsification E24	25
9. Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées	26
9. 1. Préculture	26
9. 2. Culture	26
9. 3. Mesure de la concentration microbienne	26
9. 3. 1. Méthode de densité optique	26
10. Etude de l'optimum du pH	27
11. Etude de l'optimum de température	27
12. Tolérance des souches au gasoil	27

Chapitre III : Résultats et discussions

2. Origine des isolats bactériens sélectionnés	28
3. Isolement des isolats susceptibles à dégrader le gasoil	28
4. Caractérisation des isolats purifiés.....	29
5. Utilisation des schémas d'identification des principaux groupes bactériens	32
6. Identification de souches sélectionnées	34
6.1. Utilisation d'ABIS en ligne	36
7. Index d'émulsification E24	38
8. Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées	40
9. Etude de l'optimum du pH	42
10. Etude de l'optimum de température	44
11. Tolérance des souches au gasoil	45
Conclusion et perspectives	48
Bibliographie	50
Annexes	

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Genres bactériens susceptibles à dégrader les hydrocarbures	13
Tableau 2 : Origine des isolats sélectionnés	28
Tableau 3 : Aspect macroscopique des colonies isolées	29
Tableau 4 : Aspect microscopique des isolats sélectionnés	30
Tableau 5 : Identification biochimique des isolats sélectionnés	35
Tableau 6 : Identification des souches à l'aide d'ABIS online Bacterial identification	36
Tableau 7 : Calcul de l'index d'émulsion sur le gasoil	38

Liste des figures

	Page
Figure 1: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers	03
Figure 2: Différents fonctions des liquides du forage	07
Figure 3: Triangle de biodégradation	14
Figure 4: Orientation préliminaire d'identification des souches N5, N20 et N4a	32
Figure 5: Orientation préliminaire d'identification des souches N18, N11 et N19	33
Figure 6: Orientation préliminaire d'identification des souches N13 et N17a	33
Figure 7: Index d'émulsion E24 pour les souches étudiées	38
Figure 8: Cinétique de croissance de la souche N18 dans le milieu BH avec 2 % de gasoil ...	40
Figure 9: Cinétique de croissance de la souche N20 dans le milieu BH avec 2 % de gasoil ...	41
Figure 10: Effet du pH sur la croissance de la souche N18 utilisant du gasoil à 30°C	42
Figure 11: Effet du pH pour la croissance de la souche N20 utilisant du gasoil à 30°C	43
Figure 12: Effet de température sur la croissance de la souche N18 utilisant du gasoil à 30°C..	44
Figure 13: Effet de température sur la croissance de la souche N20 utilisant du gasoil à 30°C..	44
Figure 14: Effet de la concentration initiale de gasoil sur la croissance de N18 à pH 7 et 30°C.	45
Figure 15: Effet de la concentration initiale de gasoil sur la croissance de N20 à pH 7 et 30°C.	46

Liste des Photo

	Page
Photo 1 : Localisation de site d'échantillonnage de Nomérate –Ghardaia	20
Photo 2: Bourbier principal situé à Noumérate – Ghadaïa	20
Photo 3: Localisation de site d'échantillonnage de Sebseb – Ghardaia	21
Photo 4: Bourbier principal situé à Sebseb – Ghardaia	21
Photo 5: Isolement des isolats susceptibles à dégrader le gasoil	28
Photo 6: Aspect macroscopique des isolats sélectionnés	29
Photo 7: la présence des spores chez l'isolat N18 (Gx40)	30
Photo 8: Aspect microscopique obtenu après la coloration de Gram (Gx40)	31
Photo 9: Capacité de production des biosurfactants par les souches sélectionnées	39
Photo 10: Croissance de la souche N18 à différents pH dans le milieu BH contenant 2% de gasoil	43
Photo 11: Croissance de la souche N18 à différents concentrations initiales en gasoil dans le milieu BH	46

Introduction

Après l'augmentation des prix mondiaux du pétrole en 1999, l'Algérie a lancé des investissements considérables dans l'activité du forage pétrolier afin d'augmenter sa production du pétrole, et par conséquent ces revenus en dollars. Le nombre moyen des puits forés a dépassé 57 par an pour la période 2000-2007 (**Remouche, 2008**) et en 2017 la société Sonatrach va réaliser 290 puits nouveaux (**de Souza, 2016**).

Cependant, Les activités du forage pétrolier laisse un grand nombre de bourbiers polluant le sol à cause de rejet des déchets liquides et solides comprenant les déchets à base d'huile issus essentiellement de l'utilisation des fluides de forage, et de l'entretien des machines et des équipements ainsi que des déchets de base de vie (**Gbadebo et al., 2010**).

Il existe de nombreuses techniques de dépollution pour traiter les sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers, plus ou moins efficaces selon la nature du contaminant. Parmi ces techniques il y a l'incinération, le lavage des sols, L'oxydation chimique, l'extraction chimique, l'oxydation des fluides supercritiques, la volatilisation, l'extraction de vapeur, l'encapsulation et l'extraction de liquide supercritique (**Roberts, 1998**).

Parmi les meilleures technologies de dépollution, la bioremédiation qui est basée sur l'utilisation des micro-organismes, et qui reste la méthode la plus connue grâce aux faibles répercussions sur l'environnement, sur les travailleurs et sur la population, ainsi que par leur coût raisonnable d'application et son durabilité(**Dufresne, 2013**).

Notre étude a pour objectifs d'isoler et de caractériser des bactéries hydrocarbonoclastes, et présentant un potentiel de production de biosurfactants à partir de sols pollués par des hydrocarbures au niveau de deux bourbiers de rejet de fluide du forage dans la zone de noumirate et sebseb – Ghardaia.

Nous avons structuré notre manuscrit en trois chapitres. Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique portant sur les hydrocarbures, la pollution des sols par les hydrocarbures et la dégradation microbienne des hydrocarbures. Le deuxième chapitre décrivant le matériel et les méthodes utilisés et le dernier chapitre consacré aux résultats et discussion suivi d'une conclusion et perspectives.

Revue
Bibliographique

I. Données sur les hydrocarbures

1.- Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques formés d'hydrogène (H) et de carbone (C) liés dans des chaînes ou des cycles (Kemp, 1998). Ils ont la formule brute: C_nH_m où n et m sont des entiers naturels (Ayadim, 2014). Ils peuvent être solides, liquides ou gazeux. Les hydrocarbures, tels que le pétrole et le gaz naturel, sont principalement utilisés comme combustibles, mais sont également appropriés pour être utilisés comme lubrifiants et comme matières premières pour une variété de matériaux industriels (Kemp, 1998). Certains sont toxiques, tels que le benzène ou les aromatiques polycycliques (Smith et Scott, 2005).

2.- Origine des hydrocarbures

Le pétrole brut et le gaz naturel sont formés au cours de millions d'années par décomposition des végétaux et d'organismes marins, comprimés sous le poids des sédiments. Comme ils sont plus légers que l'eau, ils ont migré pour combler les vides existant dans ces formations sous-jacentes. Ce mouvement vers le haut s'est arrêté lorsqu'ils ont atteint des couches denses imperméables ou des roches non poreuses (Khodja, 2008).

La biosynthèse et les mécanismes de transformations (dissolution, évaporation, photo-oxydation, adsorption/désorption sur des particules, transformations biologiques, ...) conduisent à un mélange de composés dont la spécificité dépend des organismes producteurs et des conditions physicochimiques du milieu. Ainsi, la stabilité de ces composés a fait d'eux des marqueurs biologiques et géochimiques d'une très grande valeur. En effet, le développement des techniques analytiques (chromatographiques et spectroscopiques) a démontré la complexité de ces composés présents en faibles quantités dans les colonnes d'eau et les sédiments (Bekenniche, 2014).

Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines (Soltani, 2004):

2.1.- Les hydrocarbures fossiles: qui proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches sédimentaires.

2.2.- Les hydrocarbures actuels: sont produits par bactéries décomposant la matière organique. Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais) et en quantité limitée. Le changement climatique pourrait accroître cette production dans les régions polaires et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre.

2.3.- Les rejets industriels et urbains : sont considérés comme la principale source d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques

3. Classification

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane non cycliques (ou paraffines), des cycloalcanes (ou naphènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques. D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et des composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes (Gruyer et Groleau, 2015).

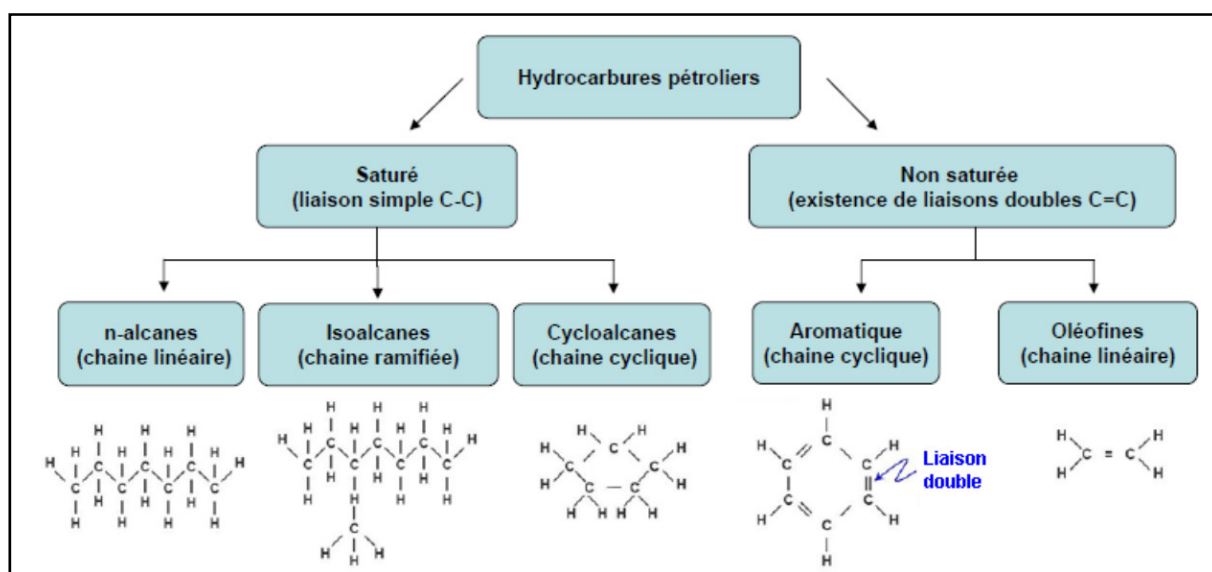


Figure 1. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Gruyer et Groleau, 2015).

Les hydrocarbures peuvent être essentiellement classés en quatre catégories selon la formule structurelle

3.1.- Hydrocarbures saturés (Alcane)

Les alcanes sont des hydrocarbures saturés (ils ne comportent que des atomes d'hydrogène et de carbone et chaque carbone a quatre liaisons différentes), à chaîne linéaire ou ramifiée (appelés autrefois paraffines), de formule générale C_nH_{2n+2} . Parmi les hydrocarbures saturés on distingue (Milcent, 2007):

3.1.1.- Alcane linéaire

Les alcanes linéaires (*n*-alcane, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (Soltani, 2004).

3.1.2.- Alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes(Soltani, 2004).

3.1.3.- Cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut(Soltani, 2004).

3.2.- Hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier(Soltani, 2004).

3.3.- Composés polaires

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, telles que:

- des composés oxygénés: phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...
- des composés soufrés: mercaptans, sulfures, disulfures,...
- des composés azotés: pyridines, quinoléines,...

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés(Soltani, 2004).

3.4.- Asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (O, N, S), et d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables(Soltani, 2004).

II.- Pollution des sols par les hydrocarbures

1.- Définition du sol

Il est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Du point de vue pédologique, le sol représente la partie des formations naturelles superficielles soumises aux processus pédologique et subissant des évolutions plus ou moins importantes de la composition chimique et de la constitution minéralogique. Le sol résulte de l'évolution de la roche mère sous-jacente transformée en surface par divers facteurs (climat, nature de la roche, activité biologique...) (**Gabet, 2004**).

2.- Compositions du sol

Le sol est un système hétérogène et complexe. Il est composé d'une phase solide représentée par les particules du sol, une phase liquide représentée par l'eau du sol (qui peut être enrichie en de nombreux composés et particules) et une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol (**Gabet, 2004**). La composition du sol varie avec le temps, le lieu et l'utilisation. Les particules de roche diffèrent en taille et en composition chimique en fonction de facteurs tels que la source de roche d'origine et la nature et le climat qui ont eu lieu. La matière organique peut être humus ou d'autres restes de plantes ou d'animaux morts et en décomposition, mais elle comprend également des macro-organismes comme les vers de terre et les microorganismes tels que les bactéries (**Kemp, 1998**).

3.- Forage pétrolier

On appelle "forage pétrolier" l'ensemble des opérations permettant le creusement de trous pour atteindre en sous-sol de nouvelles zones susceptibles de contenir des hydrocarbures (**Soussa, 2011**). Le premier forage pétrolier a été effectué le 27 Août 1859 par l'Américain E.L. Drake à Titusville (Pennsylvanie), et comme l'objectif était de forer le puits, de procéder à sa complétion, qui consiste à amener un puits en phase productive après qu'il a été foré, depuis 1859, les opérations de forage, a connu une grande évolution afin de résoudre les nombreux problèmes, à la fin des années 1930, les recherches ont été concentrées sur la composition et les propriétés des fluides de forage. De 1947 à 1957, la recherche s'est plus focalisée sur les tests des produits de base utilisés dans les fluides de forage, en essayant de lier les propriétés des fluides aux problèmes de stabilité des puits et à l'efficacité du nettoyage du trou (**Khodja, 2008**).

L'implantation d'un forage est des études géologique et géophysiques effectuées sur un bassin sédimentaire, ceci nous permet de nous faire une idée de la constitution de sous-sol et des possibilités de gisements, sans pour autant préciser la présence d'hydrocarbures. L'opération de

forage peut alors confirmer les hypothèses faites et mettre en évidence la nature des fluides contenus dans les roches (**Hadj Abbas, 2011**).

3.1.- Impact du forage sur l'environnement

La présence d'un polluant dans le sol n'est pas en soi un danger. Le risque apparaît dès lors que ce polluant peut être mobilisé et agir sur l'environnement (faune, flore) ou homme. Pour qu'il y ait un danger, il faut trois éléments:

1. une source (un polluant),
2. un vecteur (la plante ou l'eau, qui transporte le polluant)
3. une cible (l'homme ou l'environnement).

Selon **Lemière et Chiron (2000)**, Un sol pollué représente trois types de risques environnementaux: Lessivage des hydrocarbures par les eaux d'infiltration et transfert des hydrocarbures vers les eaux souterraines et superficielles concernent, en premier, la qualité des eaux souterraines, les rendant impropres pour certaines utilisations (boire, irrigation) (**Djerbaoui, 2011**). Réintroduction des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire par les végétaux et les organismes vivants du sol. Par exemple si le polluant est absorbé par les racines d'une plante destinée à la consommation ou s'il passe dans une nappe phréatique qui sert à alimenter un réseau d'eau potable.

Le contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (**Soltani, 2004**), aussi; l'occupant du sol (cheptel de dromadaire, les enfants des nomades) qui tombent souvent en passe des borbier de forage.

Au niveau de la phase gazeuse du sol, les risques sont réels avec la présence de substances volatiles : émanations toxiques. Incendies et explosions avec des produits inflammables et explosifs en atmosphère confinée (**Bekenniche, 2014**).

3.2.- Fluide de forage

Le fluide de forage, appelé aussi boue de forage, est un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments,...) (**Khodja, 2008**).

Le fluide de forage en circulation continue durant toute la durée du forage, aussi bien dans le sondage qu'en surface. Le fluide est préparé dans des bacs à boues, il est injecté à l'intérieur des tiges jusqu'à l'outil d'où il remonte dans l'annulaire, chargé des déblais formés au front de taille. A la sortie du puits, il subit différents traitements, tamisage, dilution, ajout de produits, de façons à

éliminer les déblais transportés et à réajuster ses caractéristiques physico-chimiques à leurs valeurs initiales. Il est ensuite réutilisé (**Khodja, 2008**).

Plus important encore, certains matériaux toxiques sont utilisés pour améliorer la qualité particulière du fluide de forage, ce qui est une préoccupation majeure des environnementalistes. Cet ajout de matières toxiques contamine le système souterrain ainsi que la surface de la terre. Les fluides de forage ont été classés en trois catégories selon le fluide de base utilisé dans leur préparation : l'air, l'eau ou l'huile (**Hossain et Al-Majed, 2015**).

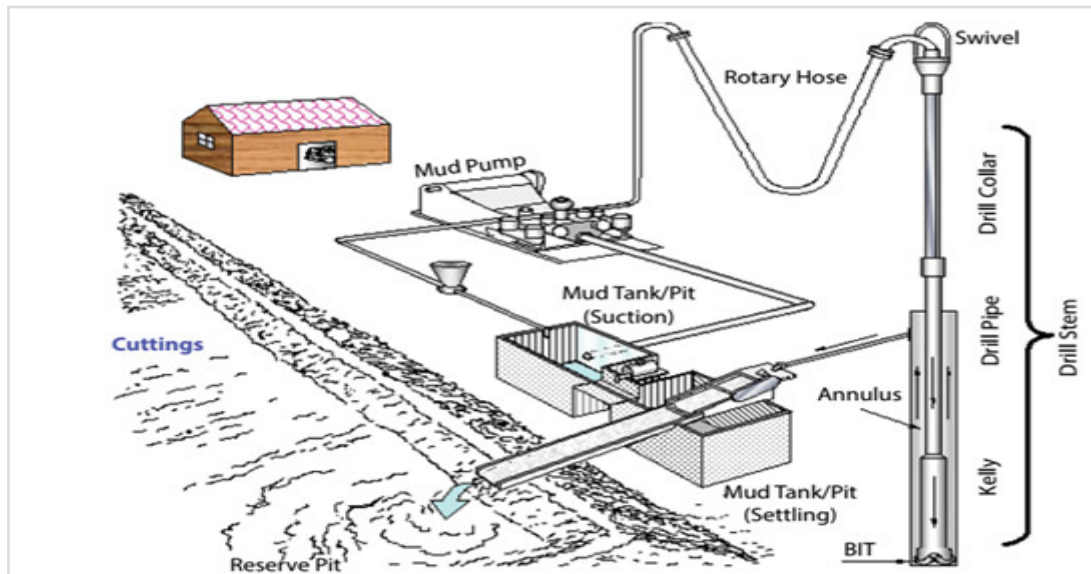


Figure 2. Différents fonctions des liquides du forage

3.2.1.- La boue à base d'eau WBM (Water Based Mud)

Ces fluides sont souvent désignés par "Water-Based Muds" ou WBM. Ils sont dans la plupart des cas constitués par des suspensions de bentonites (une argile colloïdale) dans l'eau (30 à 60 g/L) dont les caractéristiques rhéologiques et de filtration sont souvent ajustées par des polymères. La nature des électrolytes et leur concentration dans les formulations de boues à l'eau sont choisies en prenant en compte les caractéristiques de la formation (activité de l'eau des formations argileuses, dissolution des formations salines) (**Khodja, 2008**).

Exemple de compositions de Boues à base d'eau :

Boue Bentonitique :

Cette boue assure le forage des couches de surface. Elle est essentiellement constituée de :

- ◆ Bentonite : 100 Kg/m³,
- ◆ Soude caustique : 0.5 à 1.5 Kg/m³,
- ◆ Bicarbonate de soude : 0.5 à 1 Kg/m³ ?
- ◆ Amidon pour le contrôle du filtrat.

3.2.2.- La boue à base d'huile OBM (OilBasedMud)

Les fluides à base d'huile sont des fluides dont la phase continue est une huile minérale (pétrole brut, fuel, gasoil ...) et la phase dispersée est de l'eau. Les propriétés rhéologiques (thixotropie) de cette émulsion sont ajustées par l'addition d'agents viscosifiants, généralement des argiles organophiles. Les formulations peuvent contenir également des agents réducteurs de filtrat (composés asphalténiques et polymères) et d'autres additifs spéciaux (**Khodja, 2008**).

3.2.3 La boue à base d'air ou de gaz

Dans certaines régions à formations dures, sèches et imperméables, on utilise de l'air comprimé, d'azote ou du gaz naturel comme fluide de forage (Hossain et Al-Majed, 2015), on injecte à la place de la boue de forage, assure toutes les fonctions nécessaires au forage (Nguyen, 1993).

3. 3.- Les bourbiers

A la sortie du puits, le fluide de forage remonte, chargé de déblais. Une batterie d'appareils mécaniques en assure l'épuration avant d'être de nouveau réinjecté. Il s'agit essentiellement de tamis vibrants, d'hydrocyclones et de centrifugeuses. Les déblais séparés du fluide de forage sont rejetés dans une grande excavation, réalisée à cet effet, appelée: Bourbier. Il se trouve que ces rejets gardent en rétention des quantités importantes du fluide porteur par un phénomène appelé dans le jargon du métier: enrobage ou encapsulation (**Akmouci, 2009**).

Dans le domaine de l'exploitation pétrolière, une panoplie des produits chimiques est employée dans la formation des boues de forage. Ces composés de natures différents et dont la toxicité la biodégradation sont des paramètres mal définis, sont cependant déversés dans la nature. En plus des hydrocarbures (HC, tels que le gasoil) constituant majeur des boues à base d'huile, on note les déversements accidentels du pétrole, ainsi que d'une variété d'autres produits et additifs spéciaux (tensioactifs, polymères,...) qui peuvent exister sur les sites de forage. Ces rejets sont généralement stockés dans des endroits appelés « bourbiers » (**Hadj Abbas, 2011**).

III. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures

L'intérêt d'une méthode de traitement des sols pollués par les hydrocarbures se mesure à son efficacité, à son coût, à la facilité de sa mise en œuvre, à la qualité du sol obtenu après traitement ainsi qu'à la facilité de retraitement des sous-produits générés (**Bekenniche, 2014**).

Les techniques de traitement des sols pollués se développent rapidement, elles sont souvent complexes. Le traitement d'un site implique presque toujours la mise en œuvre de plusieurs techniques et procédés, simultanément ou successivement.

Trois grands types de traitement sont disponibles :

- les traitements physiques: incinération, confinement (cas de fortes concentrations en polluant) ;
- les traitements chimiques : lavage à l'eau ou extraction par solvant (principalement sur les matériaux grossiers), oxydation chimique ;
- les traitements biologiques : utilisation de la microflore autochtone ou de micro-organismes autochtones.

Tous ces types de traitement peuvent être mis en œuvre soit in situ, c'est-à-dire sans excavation des sols, soit sur site après excavation et préparation d'une aire étanche de traitement ou mise en route d'unité de traitement mobile, soit hors site dans des unités de traitement ou de stockage de grande capacité. Mis à part le confinement, la plupart des traitements conduisent à une dégradation du polluant qui peut être obtenue soit par voie physico-chimique, soit par voie biologique (**Mougin et al., 1996**).

1.- Traitements physiques

Les traitements physiques constituent la majorité des techniques mises en œuvre actuellement, est un processus de réduction du volume consistant à séparer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire (**Gabet, 2004**), transférer le contaminant vers un autre milieu, par exemple, de l'air ou de l'eau, et le recueille sous une forme concentrée. Le traitement physique utilisant les technologies de séparation se fait soit in situ, soit ex situ (le sol est excavé). Les principaux avantages du traitement in situ sont qu'il permet de remédier au sol sans avoir le fouiller ou le transporter. Il évite également les restrictions d'élimination des terres sur la redéposition des sols traités. La remédiation in situ implique généralement des temps de traitement plus longs. En raison de l'hétérogénéité de la sous-surface, il est également plus difficile d'assurer l'uniformité du traitement. Le traitement in situ doit également concerner l'évitement de la propagation de la contamination en raison de l'incitation des contaminants à s'éloigner de la zone des sols contaminés (**Fox, 1996**).

Les procédés d'absorption sur charbon, l'extraction de vapeur de sol, lavage du sol et le confinement de la source de pollution sont les plus souvent utilisés (**Gabet, 2004**).

1.1.- Traitements thermiques

Pour une destruction complète des contaminants, l'incinération est l'un des traitements les plus efficaces disponibles. Une destruction de plus de 99,99% du tétrachlorure de carbone, des benzènes chlorés et des polychlorobiphényles (**Roberts, 1998**). C'est une technique qui utilise les hautes températures pour modifier physiquement ou chimiquement les polluants (**Soltani, 2004**), et détruire les polluants en CO₂, H₂O et différents autres résidus de combustion (**Gabet, 2004**).

Les flux de déchets aqueux sont difficiles à incinérer, mais les sols contaminés peuvent être gérés efficacement (**Roberts, 1998**). Dans des incinérateurs, l'incinération se réalise en deux étapes : une première à 400°C, dite volatilisation, et une seconde dite destruction à une température supérieure à 1000°C (**Gabet, 2004**). L'incinération peut générer des produits de combustion incomplets, fumées toxiques qui se dégagent lors de la combustion, et une cendre résiduelle qui doit être éliminée comme un déchet dangereux, mais elle offre l'une des meilleures méthodes pour la destruction des composés organiques. Cependant l'incinération n'est généralement pas prise en considération pour traiter les sols contaminés par les hydrocarbures en raison de leurs coûts (**Roberts, 1998**).

2.- Traitements chimiques

C'est une technique qui sert à détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement, en provoquant des réactions chimiques entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables in situ ou après excavation des sols. La majorité des procédés exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide. Parmi les méthodes chimiques l'oxydation et la neutralisation (**Gabet, 2004**).

2.1.- Oxydation chimique

Cette technique consiste en une dégradation des contaminants en contact avec des réactifs oxydants injectés dans la zone de sols contaminés (in-situ) ou mélangés dans un conteneur adapté (ex-situ). L'oxydation chimique in-situ consiste à injecter sous pression un produit oxydant (ozone, peroxyde, etc.) à l'intérieur de la matrice des sols contaminés. Les polluants peuvent être totalement dégradés (minéralisation) ou partiellement (sous-produits plus biodégradables). Ce traitement chimique permet de générer des réactions dans la zone contaminée de façon à modifier les produits toxiques en produits qui ne nuisent pas à l'environnement (**Dufresne, 2013**).

3.- Traitements biologiques

Le traitement biologique ou bioremédiation a été définie par **Madsen (1991)**, comme un processus géré ou spontané dans lequel le catalyseur est biologique, en particulier microbien qui agit sur les composés polluants, remédiant ou éliminant la contamination de l'environnement (**Roberts, 1998**).

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action de microorganismes (bactéries, champignons...) et peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire de polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (**Gabet, 2004**).

3.1.-Bioremédiation

La Bioremédiation est l'utilisation de bactéries ou d'autres micro-organismes pour dégrader les polluants organiques (**Smith et Scott, 2005**). Ils peuvent être utilisés dans des conditions contrôlées telles que dans une exploitation d'eaux usées ou dans des bassins de stabilisation des déchets, mais ils ont également le potentiel de nettoyer les déversements accidentels de déchets dangereux pour l'environnement. (**Kemp, 1998**)

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures est un phénomène mondial qui affecte tous les aspects de l'environnement, et parmi ces aspects la contamination des sols, qui est restée un problème émergent. Des dommages coûteux ont été causés dans différentes régions du monde essentiellement par des déversements des hydrocarbures dans le sol ou l'eau (**Uchechukwuet al., 2007**).

Le sol peut être traité in situ ou il peut être extrait et traité dans un bioréacteur en tant que boue ou en sol (**Smith et Scott, 2005**). Par exemple, après le déversement de pétrole d'Exxon Valdez en Alaska en 1989, des bactéries ont été pulvérisées sur certaines plages contaminées, biostimulés à grandir par l'application d'engrais soluble dans l'eau, les bactéries nourries sur l'huile et dans un mois ont apporté une contribution mesurable au nettoyage (**Das et Chandran, 2010**).

3.1.1.- Méthodes de Bioremédiation

Le métabolisme microbien est le processus majeur de dégradation des hydrocarbures dans les sols (**Mumtaz et George, 1995**). La plupart des composés organiques contaminant les sols sont biodégradables par des microorganismes (bactéries, champignons etc.).

Des facteurs peuvent limiter potentiellement le taux de biodégradation des hydrocarbures en cours de processus de bioremédiation, parmi eux, le manque d'approvisionnement adéquat en nutriments, comme l'azote et le phosphore, et l'insuffisance de biomasse nécessaire (**Sihag, 2014**).

Deux processus ont été révélés pour augmenter l'activité des microorganismes pendant la bioremédiation: la bioaugmentation et la biostimulation (**Suthersan, 2000**).

3.1.1.1.- Bioaugmentation

La bioaugmentation consiste à ajouter des micro-organismes autochtones ou étrangers dans la zone polluée afin d'augmenter le taux de biodégradation des contaminants (**Guermouche, 2014**). Il consiste à inoculer l'environnement avec des microorganismes qui sont connus pour métaboliser facilement ces produits chimiques

Les inoculums peuvent être un micro-organisme ou un mélange des micro-organismes indigènes ou non indigènes provenant de divers milieux pollués, spécialement choisis pour leurs caractéristiques de dégradation des hydrocarbures, ils sont pré-cultivés en laboratoire ou sur sites par des bioréacteurs. Les nutriments accompagneraient habituellement la culture des inoculums(**Hassanshahian et Cappello, 2013**).

L'ensemencement des microorganismes sur le sol a d'abord été essayé vers 1968. Un inoculum de *Cellomonassp.* Et les éléments nutritifs ont permis de dégrader les contaminants hydrocarbonés plus efficacement que les engrais seuls. Depuis lors, l'ensemencement de microorganismes a été utilisé dans un certain nombre d'environnements différents pour dégrader les matières organiques, avec des succès variés (**Roberts, 1998**).

La bioaugmentation avec des organismes appropriés pour la biodégradation ou particulièrement acclimaté pour effectuer la biodégradation dans les conditions du site peut jouer un rôle important dans la bioremédiation (**Reddy et Cameselle, 2009**), et particulièrement lorsque on utilise des micro-organismes génétiquement modifiés (**Suthersan, 2000**).

3.1.1.2.- Biostimulation

Parmi les facteurs qui limitent potentiellement le taux de biodégradation des hydrocarbures, le manque d'approvisionnement en nutriments, comme l'azote et le phosphore, pour ces raisons, de nombreux scientifiques considèrent actuellement l'enrichissement - Biostimulation - en nutriments comme approche prometteuse pour la décontamination des sites pollués (**Hassanshahian et Cappello, 2013**). La biostimulation est une technologie qui consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (**Guermouche, 2014**), par l'addition de nutriments, d'oxygène ou d'autres donneurs et accepteurs d'électrons afin d'augmenter le nombre de microorganismes indigènes disponibles pour la dégradation des contaminants (**Cheremisinof, 2002**). Par exemple, La bioremédiation des aquifères contaminés par l'essence par la microflore indigène a été mise en œuvre avec succès plusieurs fois, bien que les chercheurs aient parfois signalé que la population microbienne indigène nécessitait une période d'adaptation (phase de latence) avant que la biodégradation se commence.

4. Bactéries dégradant les hydrocarbures

La dégradation microbienne est le mécanisme naturel majeur et ultime par lequel on peut nettoyer les polluants hydrocarbonés de l'environnement (**Das et Chandran, 2010**).

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes, qui a été mise en évidence en 1946 par ZoBell (**Roberts, 1998**), depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, et *Nocardia* (**Soltani, 2004**).

ZoBell a signalé que près de 100 espèces de bactéries, de levures et de moisissures, représentant 30 genres microbiens, avaient été découvertes pour avoir des propriétés hydrocarbonoclastes (**Roberts, 1998**).

Les hydrocarbures dans l'environnement sont biodégradés principalement par des bactéries, des levures et des champignons. L'efficacité déclarée de la biodégradation variait de 6% à 82% pour les champignons du sol, de 0,13% à 50% pour les bactéries du sol et de 0,003% à 100% pour les bactéries marines. Les bactéries sont les agents les plus actifs dans la dégradation des hydrocarbures, (**Das et Chandran, 2010**), au fait qu'elles assimilent mieux certaines molécules, l'usage de ces dernières est préféré, en plus, son culture étant plus rapide. De nombreux genres bactériens ont été décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures (**Florian, 2014**).

Tableau 1. Genres bactériens susceptibles à dégrader les hydrocarbures (**Roberts, 1998**)

<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Nocardia erythropolis</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Nocardia</i> sp.
<i>Azotobacter chroococcum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>A. vinelandii</i>	<i>P. methanica</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>P. putida</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Hydrogenomonas</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp.
<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Xanthomonas</i> sp.
<i>Micrococcus cerificans</i>	

5. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures

Les populations microbiennes capables de dégrader les contaminants dans le sol sont soumises à divers facteurs physiques, chimiques et biologiques qui influencent leur croissance, leur activité métabolique et même leur existence. Les propriétés et les caractéristiques des environnements dans lesquels fonctionnent les microorganismes ont un impact profond sur la population microbienne, le taux de transformations microbiennes du contaminant, les voies de biodégradation et la persistance des contaminants. L'impact des facteurs est évident à partir d'études, montrant la variation de biodégradabilité d'un contaminant d'un environnement à une autre. Cependant, dans la nature, les microorganismes sont exposés à des conditions extrêmement différentes. Ils peuvent avoir un apport insuffisant de nutriments inorganiques; Une pénurie de facteurs de croissance essentiels, de températures et de valeurs de pH à leur extrême tolérance; et les niveaux de contaminants qui accentuent la population microbienne. Les contaminants à des niveaux très élevés peuvent retarder la croissance, inhiber l'activité métabolique et entraîner également une perte de viabilité. En conséquence, les extrapolations des tests de laboratoire, effectuées dans des conditions contrôlées, aux conditions sur le terrain peuvent présenter des risques (Suthersan, 2000).

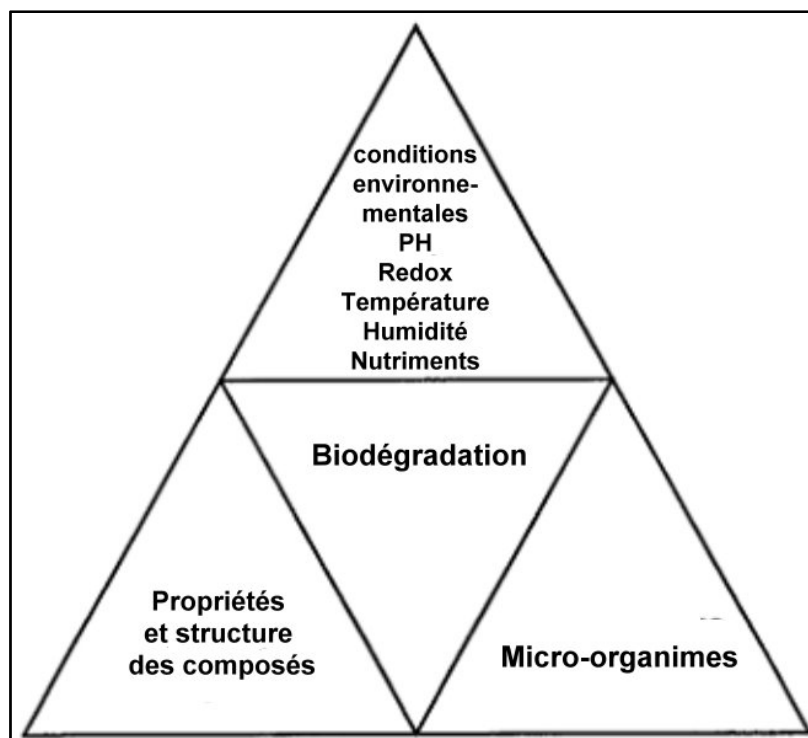


Figure 3. Triangle de biodégradation (Roberts, 1998)

5.1.- Facteurs microbiens

Les bactéries forment un groupe distinguant par rapport aux autres micro-organismes dans la bioremédiation, en raison de leur capacité de croissance rapide et la dégradation de divers contaminants (Suthersan, 2000).

5.2.- Nutriments

La cellule microbienne vivante est principalement composée de carbone, hydrogène, oxygène et azote, ces quatre éléments constituent environ 95% du poids cellulaire. Deux autres éléments, le phosphore et le calcium, représentent 70% du reste (**Suthersan, 2000**).

Les éléments nutritifs sont des ingrédients très importants pour une biodégradation réussie des polluants hydrocarbonés, certains de ces nutriments pourraient devenir un facteur limitant affectant ainsi les processus de biodégradation (**Das et Chandran 2010**).

Le processus de biodégradation peut être amélioré par l'ajout de nutriments essentiels tels que l'azote et le phosphore. Dans le cas de déversements d'hydrocarbures où le manque d'azote peuvent être aiguës; Le carbone, l'azote et le phosphore sont ajoutés dans le rapport d'environ 100: 10: 1 (C: N: P) (**Kothari et al., 2014**).

D'autre part, des concentrations excessives de nutriments peuvent également inhiber l'activité de biodégradation. Plusieurs auteurs ont signalé les effets négatifs des taux élevés de NPK sur la biodégradation des hydrocarbures, en particulier sur les composés aromatiques (**Das et Chandran 2010**).

5.3.- Facteurs Physico-Chimique

5.3.1 Teneur en oxygène

La teneur des sols en oxygène est contrôlée par différents facteurs. Un minimum d'espaces occupés par l'air, 10% en volume est généralement considéré comme nécessaire pour l'activité microbienne en aérobies, moins de 1% de volume d'oxygène pour l'activité microbienne en anaérobies, et de 10 à 40% d'oxygène pour une dégradation optimale des hydrocarbures L'oxygène peut être fourni sous plusieurs formes, l'oxygène pur; air atmosphérique; peroxyde d'hydrogène(**Roberts, 1998**).

5.3.2.- L'aération

La disponibilité de l'oxygène est un facteur critique dans la biodégradation aérobie des hydrocarbures, l'activité des micro-organismes se déroule plus rapidement si l'oxygène suffisant fourni (**Mahendra et al., 2010**). Une large fraction de la population microbienne du sol utilise l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons dans son métabolisme (**Bidaud, 1998**). Au cours de la biodégradation aérobie, l'oxygène moléculaire est réduit à l'eau, tandis que l'hydrocarbure est oxydé pour créer de l'énergie, de la masse cellulaire et du dioxyde de carbone (**Eng, 1998**).

5.3.3.- Activité de l'eau

L'humidité est un paramètre très important à la bioremédiation. La teneur en humidité du sol affecte la biodisponibilité des contaminants, le transfert de gaz, le niveau de toxicité efficace des

contaminants, le mouvement et le stade de croissance des microorganismes et la distribution des espèces (**Hatzikioseyan, 2010**).

5.3.4.- Le pH

il n'est pas surprenant que le pH affecte dramatiquement la capacité du microorganisme à mener ces fonctions cellulaires, telle que la croissance bactérienne, le transport membranaire, la structure tridimensionnelle des enzymes et les protéines de transport cellulaire, les forces protonmotives responsables de la production d'énergie dans la cellule (**Suthersan, 2000**), et aussi la dissociation et la solubilité de nombreuses molécules qui agissent directement sur les micro-organismes. Les micro-organismes ne peuvent en général pas tolérer des valeurs de pH extrêmes. Sous des conditions fortement acides ou alcalines, certains composants de la cellule microbienne peuvent être hydrolysés ou des enzymes dénaturées (**Bidaud, 1998**). L'acidité et l'alcalinité des milieux permettent de distinguer des organismes acidiphiles,; neutrophiles, basophiles (**Prescott et al., 2003**).

La plupart des environnements naturels possèdent des valeurs de pH comprises entre 5 et 9. Les activités métaboliques des microorganismes produisent des acides organiques et du HCl à partir de la dégradation des composés organiques (ou produits organiques chlorés). Lorsque des concentrations élevées de composés organiques sont présentes dans la sous-surface à faible alcalinité, un contrôle du pH peut être nécessaire pour maintenir la biodégradation continue (**Suthersan, 2000**).

5.3.5 Température

Tous les micro-organismes ont une température optimale de croissance caractéristique à laquelle ils ont leur plus fort taux de reproduction et de croissance. ils ont aussi des températures minimales de croissance en-dessous desquelles ils sont métaboliquement inactifs et ne croissent pas, ainsi que des limites supérieures de température au-delà desquelles ils ne réussissent pas à croître (**Prescott et al., 2003**).

La température ambiante de l'environnement affectait à la fois les propriétés d'hydrocarbures déversés et l'activité des microorganismes (**Das et Chandran, 2010b**).

La température optimale de croissance et la gamme des températures qu'un micro-organisme peut tolérer déterminent la survie d'un micro-organisme et le rôle qu'il va jouer dans un écosystème donné (**Bidaud, 1998**). La température affecte la solubilité des hydrocarbures, bien que la biodégradation des hydrocarbures puisse se produire sur une large gamme de températures, la vitesse de biodégradation diminue généralement avec la température se situent généralement entre 30 et 40 °C dans les environnements du sol, de 20 à 30 °C dans certains milieux d'eau douce et de

15 à 20 °C dans les milieux marins, une biodégradation importante des hydrocarbures a été souvent signalée dans des environnements psychrophiles dans les régions tempérées (**Das et Chandran, 2010**).

5.3.6.- Salinité

La salinité exerce un effet osmotique sur les micro-organismes, qui ont aussi des besoins en sels comme NaCl, KCl et MgCl₂. Les fortes concentrations ont tendance à dénaturer les protéines, c'est-à-dire à casser la structure tertiaire des protéines qui est essentielle à l'activité enzymatique, et inhiber la biodégradation (**Bidaud 1998**).

Les micro-organismes ont des besoins limités en sels et sont inhibés par des teneurs en NaCl supérieures à 0.2 M, sauf les micro-organismes halophiles qui croissent en milieux salins et supportent bien des teneurs en NaCl jusqu'à 7 M (**Willey, 2009**).

5.3.7 Potentiel Oxydation-Réduction (Redox)

Le potentiel de Redox est désigné par le symbole Eh. Il est utilisé pour mesurer l'oxydation ou la réduction d'environnement, Eh supérieur à zéro est généralement un environnement oxydant, et Eh inférieur à zéro, un environnement réducteur. La gamme pratique d'Eh dans l'environnement naturel est de +800 mV (O₂ élevé, sans processus d'appauvrissement en O₂) à environ -400 mV (systèmes à haute teneur en H₂) (**Suthersan, 2000**).

De nombreuses réactions enzymatiques sont des réactions d'oxydo-réduction dans lesquelles un composé est oxydé et un autre réduit. La capacité d'un organisme à réaliser des réactions d'oxydo-réduction dépend de l'état oxydo-réducteur de l'environnement. Un potentiel redox Eh positif, indique un environnement qui favorise les oxydations, alors qu'un Eh négative, indique un environnement réducteur (**Bidaud, 1998**).

Le potentiel de Redox est mesuré à l'aide d'une électrode en platine, conjointement avec une électrode de référence. Malheureusement, l'interprétation des valeurs Eh mesurées est très difficile, car les systèmes naturels sont rarement atteints l'équilibre (**Suthersan, 2000**).

6.- Les bio-surfactants

6.1.- Définition :

Les surfactants (SURFaceACTiveAgeNTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants).

Les bio-surfactants sont des molécules avec une région polaire (hydrophilie) et une région non polaire (hydrophobe), et sont donc considérés comme amphipathiques, produits par plusieurs microorganismes, et peuvent également réduire la tension superficielle à l'interface air-eau entre

deux liquides non miscibles ou entre l'interface eau solide (**Armendáriz et al., 2013**). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures. La tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/m en présence d'un surfactant, synthétique ou naturel mais cette capacité reste relative et varie d'un surfactant à un autre (**Al-Araji et al., 2007**)

L'application de biosurfactants dans une opération de dépollution des sols et eaux pollués aux surfactants chimiques peut avoir des effets inhibiteurs sur la biodégradation. Par rapport aux biosurfactants synthétiques, l'application de biosurfactants dans les processus de bioremédiation peut être agréable d'un point de vue social à cause des biosurfactants produite naturellement (**Onur, 2015**).

6.2.- Type des biosurfactants

Les biosurfactants ont été nommés d'après le sucre, le phosphate ou l'acide aminé présents dans leurs structures et sont divisés en différents groupes (**Jaysree, 2015**)

- **Glycolipides** - le degré de polarité dépend des hydrocarbures utilisés comme substrat; Exemples: les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* et les sophorolipides produits par des espèces de *Candida*.
- **Lipopolysaccharides** - qui ont normalement une masse moléculaire élevée et sont solubles dans l'eau; Exemple: émulsan, un émulsifiant extracellulaire produit à partir d'hydrocarbures par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*
- **Lipopeptides** - exemple: la surfactine produite par *Bacillus subtilis* (l'un des tensioactifs biologiques les plus puissants rapportés dans la littérature)
- **Phospholipides** - structures communes à de nombreux microorganismes, par exemple: biosurfactant de *Corynebacterium lepus*
- **Les acides gras, les lipides neutres** (certains classés comme glycolipides) et les protéines hydrophobes (**Sobrinho et al., 2014**).

Classification

Généralement les biosurfactants sont classés selon plusieurs critères, en fonction de leur poids moléculaire, la structure de leurs groupes polaires, la nature biochimique (ou origine microbienne) et la charge de leur groupes polaire (**Sobrinho et al., 2014**).

Sur la base du poids moléculaire, ils sont divisés en biosurfactants de faible masse moléculaire, y compris les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides, et des biosurfactants de haute masse

moléculaire contenant des polysaccharides amphipathiques, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biopolymères(**Plociniczak et al., 2011**).

Sur la base de charge électrique de la partie polaire du biosurfactant, on classe les comme anioniques, cationiques, non ioniques ou amphotères (Sobrinho *et al.*, 2014).

6.4.- Applications environnemental des biosurfactants

En raison de leurs structures et propriétés, les biosurfactants ont des applications dans différents procédés industriels et environnemental (**Tadros, 2005**), ainsi que des utilisations nouvelles sont possibles à l'avenir (**Sobrinho et al., 2014**).

Pour l'environnement, est appliqué dans la bioréstauration et le traitement des eaux usées, sans danger (**Kedidi, 2014**). Les contaminations environnementaux causées par les activités industrielles est souvent due à la libération accidentelle ou délibérer de composés organiques ou inorganiques dans l'environnement, ce qui représente un problème d'assainissement, car ces composés se lient facilement aux particules du sol et se propagent dans un milieu aqueux (**Sobrinho et al., 2014**). L'élimination de ces substrats hydrophobes qui sont étroitement liés au sol, sont principalement éliminés par désorption par des biosurfactants (**Jaysree, 2015**).

Le but de l'application de biosurfactants dans la décontamination de composés organiques, tels que les hydrocarbures, est d'améliorer la biodisponibilité de ces composés ou de se mobiliser et d'éliminer les contaminants par une pseudo-solubilisation et une émulsification lors du nettoyage. D'autre part, l'application de biosurfactants dans la récupération de composés inorganiques, tels que les métaux lourds, implique la chélation et l'élimination de ces ions pendant la phase de lavage, ce qui est facilité par des interactions chimiques entre les composés amphipathiques et les ions métalliques (**Sobrinho et al., 2014**).

Chapitre II

Matériel et méthodes

1.-Zone d'échantillonnage

La wilaya de Ghardaïa située à 600 Km au Sud de la capitale Alger, sur une altitude moyenne de 600 m environ. Elle a les coordonnées géographiques suivantes: la longitude de 3°.45 Est et la latitude de 32°.50 Nord. Elle se trouve dans le plateau rocailleux de calcaire appelé chebka (filet). Ce dernier est le lieu de plusieurs opérations de forage pétrolier dans ces dernières années.

2.-Echantillonnage et prélèvement

Deux bourbiers ont été sélectionnés pour effectuer les prélèvements qui sont aux voisinages des puits suivants :

* A partir du bourbier de puits situant au point GPS 32°22'46.8"N 3°43'43.0"E, deux prélèvements dans des endroits différents; respectivement à 1 et 2m de l'extrémité du bourbier.



Photo 1. Localisation de site d'échantillonnage de Nomérate-Ghardaia (image Google maps 2017).



Photo 2. Bourbier principal situé à Noumérate - Ghadaïa

* A partir du bourbier de puits situant au point GPS 32°09'08.9"N 3°43'55.9"E, deux prélèvements dans des endroits différents; respectivement à 1 et 2 m de l'extrémité du bourbier.



Photo 3. Localisation de site d'échantillonnage de Sebseb- Ghardaia (image Google maps 2017).

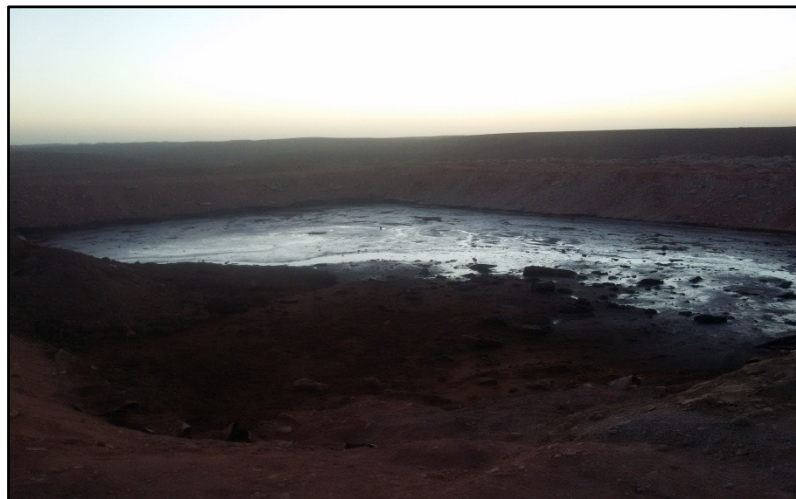


Photo 4. Bourbier principal situé à Sebseb - Ghardaia

Les échantillons d'environ 100 g pour chacun ont été prélevés aseptiquement d'une profondeur de 20 cm et mis dans des flacons en verre stériles.

3. Isolement

3. 1.- Préparation des dilutions

A partir de chaque échantillon de sol destiné à l'analyse microbiologique, 1 g de sol est pesé puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml de l'eau physiologique préalablement autoclavée. Le tube est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes. Le contenu du tube représente la solution mère.

à partir de la solution mère, une série de dilution variant de 10⁻¹ à 10⁻⁵ a été préparée, en prendre 1 ml par une pipete pasteur et en le mettre dans un tube contenant 9 ml l'eau physiologique stérile, c'est la dilution 10⁻¹ (la même méthode pour les quatre autres dilutions) (Sonam et al. 2011).

3. 2.- Ensemencement par étalement sur gélose nutritive

Un volume de 0,1 ml est prélevé à l'aide d'une micropipette avec un embout stérile, puis déposé au centre de la gélose préalablement fondue est réparti dans des boîtes. Ce volume étalé à l'aide d'une pipette râteau sur toute la surface de gélose. Les boîtes de pétri sont mises dans l'étuve à 30 °C.

Après 24h à 48h d'incubation à 30°C.

4.- Purification

Il est important de faire une bonne purification pour isoler un micro-organisme pur. Ceci est atteint par repiquages répétés sur gélose nutritive par la méthode d'ensemencement par strie.

L'opération de purification est renouvelée à deux reprises en prenant chaque fois une colonie bien isolée sur gélose. Ceci conduit à l'obtention d'une culture pure vérifiée par observation macroscopique et microscopique.

5.- Conservation des souches purifiées

Une colonie est prélevée de la souche pure trouvée dans la boîte de pétri à l'aide de pipete pasteur et ensemencée dans des tubes inclinés de gélose nutritive puis conservée à 4°C.

6.- Isolement des souches susceptibles à dégrader le gasoil

Pour isoler les souches susceptibles à dégrader le gasoil, des tubes à essai contenant chacun 5 ml du milieu Bushnell Haas (Milieu pour étudier l'utilisation d'hydrocarbures par des microorganismes, sa composition est en annexe) préalablement autoclavés puis additionnés à raison 2 % du gasoil(**Atlas, 2005**). On ajoute l'inoculum à l'aide d'une anse de platine à partir de la boîte de pétri contenant la souche bactérienne pure, on ferme les tubes puis on les incube à une température de 30°C, sous agitation de 150 rpm pendant 24 heures.

Après incubation, on examine les tubes pour la présence ou l'absence de turbidité dans chaque culture. On note les observations sur l'apparence du milieu, claire ou trouble (**Cappuccino et Welsh, 2017**).

Composition du Milieux de culture Bushnell-Haas

Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄).....	1.0g
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄).....	1.0g
Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃).....	1.0g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O).....	0.2g
Chlorure de fer (FeCl ₃)	0.05g
Chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.02g

7.- Identification des souches purifiées

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur des études morphologique et biochimique.

7. 1.- Etude morphologique

7. 1. 1.- Etude macromorphologique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies sur les milieux d'agar peut être très distinctive pour les espèces isolées. L'observation à l'œil nu des caractéristiques remarquables des colonies, c'est-à-dire de leur morphologie coloniale, La couleur, l'élévation, la surface, la forme et la taille, car ces caractéristiques peuvent fournir des indices pour l'identification préliminaire du micro-organisme, bien que l'identification finale ne puisse être faite que par la morphologie seule (**Morello et al., 2003**).

7. 1. 2.- Etude micro-morphologique

Il servira à rechercher les micro-organismes, à étudier la morphologie, à voir des spores, des capsules, à noter l'existence et le type de la mobilité.

7. 1. 2. 1.- Etat frais

Coloration au bleu de méthylène permet de visualiser la forme et le mode de regroupement des cellules bactériennes(**Cappuccino et Welsh, 2017**).

7. 1. 2. 2.- Coloration de Gram

C'est une double coloration mise au point en 1884 par le médecin Christian Gram, qui permet d'apprécier la forme des bactéries et le mode d'arrangement des cellules, et surtout de déterminer le Gram (La constitution de la paroi bactérienne).

Après réalisation d'un frottis sur une lame de microscope, procéder à la coloration qui se déroule comme suit (**Cappuccino et Welsh, 2017**):

- Le frottis est recouvert d'une solution de violet de gentiane pendant 1 min 30s
- Le colorant est éliminé et le frottis est placé dans deux bains de lugol chacun, pendant « 45 s »
- La lame est décolorée à l'alcool pendant «30s », rincée à l'eau, puis recouverte par la fuchsine pendant «1 min 30s ».
- La fuchsine est éliminée puis la lame est rincée, égouttée et séchée à l'aide du bec benzène

7. 1. 2. 4.- Mobilité

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries. Pour observer la mobilité, on doit prendre garde à ne pas détruire les flagelles bactériens lors du prélèvement et de la préparation de la lame.

Une petite goutte d'eau stérile déposée sur une lame, puis une colonie sur gélose est prélevée et incorporée progressivement dans la goutte d'eau, la lame est recouverte après par une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air, ensuite l'observation est effectuée à l'objectif 40 (**Delarras, 2014**).

- Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions).

7. 1. 2. 5. Recherche des spores

On peut mettre en évidence les spores bactériennes dans les corps bactériens en faisant une coloration dite « négative ». En effet, la spore n'est pas colorée et reste donc incolore dans un corps bactérien coloré. La coloration la plus utilisée dans ce cas est la coloration au bleu de méthylène.

Sur un frottis bactérien correctement fixé à la chaleur, on fait couler la solution de bleu de méthylène jusqu'à ce que toute la lame soit couverte pendant 1 minute. Après on rince la lame par l'eau. Ensuite le frottis bactérien est séché, puis observé au microscope à l'objectif 100 à immersion.

Si les cellules bactériennes contiennent des spores, ils apparaissent incolores dans des corps bactériens bleus(**Akmouci, 2009**).

7. 2.- Etude biochimique

7. 2. 1.- Test de catalase

L'enzyme catalase sert à la détoxification de l'eau oxygénée produite au cours de certaines réactions métaboliques, présente chez beaucoup de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies et souvent absente chez les bactéries anaérobies.

Une colonie bactérienne est déposée sur une lame propre contenant une goutte d'eau oxygénée, la lecture se fait immédiatement, et à l'œil nu. Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase, si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme (**Cappuccino et Welsh, 2017**).

7. 2. 2.- Test d'oxydase

Ce test est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, on prélève une colonie bactérienne puis on la dépose sur un disque d'oxydase (contient le chlorhydrate ou le N-diméthylparaphénylène diamine qui est utilisé comme réactif), et l'imbibe avec une goutte d'eau, après 30 secondes, la réaction positive indique qu'il a eu oxydation du réactif phénylènediamine pour former un composé coloré en violet, l'indophénol. Une réaction tardive ou une absence de couleur indique une réaction négative(**Delarras, 2014**).

7. 2. 3.-Etude des types respiratoires

Le milieu viande foie permet de déterminer le type respiratoire d'une bactérie, c'est-à-dire définir son comportement vis-à-vis du dioxygène.

Chaque souche pure est ensemencée sur la gélose semi solide Viande-foie (VF) et incubée à 30°C. Ce milieu présente un gradient de concentration en O₂, plus abondant en surface. Le type respiratoire est exprimé par la localisation du niveau de la croissance bactérienne dans le tube:

- Colonies dans tout le tube: Bactéries aérobies-anaérobies facultatives.
- Colonies en haut du tube: Bactéries aérobies strictes.
- Colonies en haut du tube légèrement sous la surface: bactéries micro-aérophiles
- Colonies en bas du tube: bactéries anaérobies strictes(**Delarras, 2014**).

7. 3.- Utilisation des galeries API

Les galeries API 20E, 20 NE et API STAPH sont des moyens très spécifique d'identification bactérienne, comporte des microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé, et homogénéiser dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique). Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture des résultats a été faite conformément aux instructions. Il est à noter que l'information provenant de la base de données du système d'identification APIWEB des microorganismes est basée sur les résultats de l'étude des souches cliniques humaines. Pour cette raison, l'identification par cette base n'a pas été entièrement utilisée. Les résultats des réactions sont été considérés pour l'identification des bactéries (Pérez-Armendáriz et al., 2013).

8. Sélection des souches productrice des bio surfactants

8. 1.- Index d'émulsification E24

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (Gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture) (**Kedidi, 2014**). Les souches avec des indices d'émulsification supérieurs à 50% ont été définis comme des producteurs potentiels de biosurfactants (**Gözde, 2015**).

Le test consiste à mélanger 3 ml de culture bactérienne avec 2 ml du gasoil (60/40 v/v) précise dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant deux minutes et laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante. Après 24 heures on mesure la hauteur de l'émulsion et on calcule l'index d'émulsificationE24 selon équation suivante (**Pérez-Armendáriz et al., 2013b**):

$$E24 = \frac{he}{ht} \times 100$$

he : hauteur d'émulsion.

ht : hauteur totale.

9.- Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées

9. 1.- Préculture

Une colonie est prélevée à partir d'un milieu gélosé et mise dans un tube à essai contenant 5 ml du milieu Bushnell Haas. Le tube ensuite est incubé à 30°C pendant 24h sous agitation rotative (150rpm).

9. 2.- Culture

La méthodologie utilisée pour évaluer la croissance bactérienne consiste à réaliser des cultures en milieu Bushnell Haas liquide, et utiliser le gasoil comme seule source de carbone (à 2% du volume de milieu). Dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 45 ml de milieu Bushnell Haas liquide ont étéensemencés par 5 ml de pré-culture de chaque souche sélectionnée. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant cinq jours, et chaque douze heures on effectue un prélèvement de 2 ml pour mesurer l'absorbance à 600 nm

9. 3. Mesure de la concentration microbienne

9. 3. 1. Méthode de densité optique

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé en mesurant la densité optique (DO) au moyen d'un spectrophotomètre UV, marque SpectroScan 40, à une longueur d'onde de 600 nm. La mesure de la densité optique est basée sur la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon.l.C$$

A : densité optique.

I_0 : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière émergente.

ϵ : absorption molaire (absorption d'une solution $c = 1$ mole/l dans une cuvette de dimension de $l = 1$ cm) [l / mole. cm].

C : concentration molaire [mole/l].

l : épaisseur de la cuvette [cm].

10. Etude de l'optimum du pH

Pour étudier les pH optimaux de croissance des souches, des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 45 ml de milieu BH préalablement autoclavé, additionnés à raison 2% du gasoil et ajustés à des différents pH (4, 8, 10 et 12) à l'aide du NaOH ou du HCl (0,1 N). Ces erlenmeyer sont été inoculés avec 5 ml des suspensions de deux souches qui ont meilleur indice d'émulsification de phase hydrophobe de gasoil, et incubés à 30°C, sous agitation de 150 rpm et après 24 heures un prélèvement de 2ml est effectué dans un éppendorf.

Pour éliminer le gasoil contenant dans le prélèvement ceci est centrifugé à 10000g pendant 10 minutes. La phase aqueuse dans l'éppendorf est négligée et le culot est gardé puis dilué dans l'eau distillée. La mesure de l'absorbance est effectuée à 600 nm (**Palanisamy et al., 2014**).

11. Etude de l'optimum de température

Dans le but d'étudier les températures optimales de croissance de deux souches qui ont meilleur indice d'émulsification de phase hydrophobe de gasoil, des erlenmeyers de 250 ml contenant 45 ml de milieux BH préalablement autoclavé additionnés à raison de 2% de gasoil et ajustés au pH 7 à l'aide du NaOH ou du HCl (0,1 N), ont été inoculés avec 5 ml d'inoculum de deux souches sélectionnés, et incubés à différentes températures 30, 35 et 40°C, sous agitation de 150rpm, après 24 heures un prélèvement de 2ml est effectué dans un éppendorf.

Pour éliminer le gasoil contenu dans le prélèvement, une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes est nécessaire. La phase aqueuse dans l'éppendorf est négligée et le culot est gardé puis dilué dans l'eau distillée. La mesure de l'absorbance est effectuée à 600 nm (**Palanisamy et al., 2014**).

12. Tolérance des souches au gasoil

Des erlenmeyer de 250 ml contenant 45 ml de milieu BH préalablement autoclavé sont ajustés au pH 7 à l'aide du NaOH ou du HCl et additionnés respectivement à raison de 5%, 10%, 15%, 20% du gasoil, ont été inoculés avec 5 ml de suspension de deux souches qui ont meilleur indice d'émulsification de phase hydrophobe de gasoil, et incubés à une température de 30°C, sous agitation de 150rpm, après 24 heures le prélèvement de 2ml est effectué dans un éppendorf. Pour éliminer le gasoil contenu dans le prélèvement, une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes est nécessaire. La phase aqueuse dans l'éppendorf est éliminée et le culot est gardé puis dilué dans l'eau distillée. La mesure de l'absorbance est effectuée à 600 nm (**Palanisamy et al., 2014**).

Chapitre III

Résultats et discussion

1.- Origine des isolats bactériens sélectionnés

En tenant compte uniquement des bactéries cultivables, la variation des colonies sur le plan morphologiques n'est pas très élevée, cela nous a permis de sélectionner 13 sur 21 isolats qui sont différentes sur le plan macroscopique.

Ces isolats ont été ensemencés dans des tubes contenant la gélose inclinée et conservés à 4°C.

Tableau 2. Origine des isolats sélectionnés

Isolat	Echantillon	dilution	Origine (bourbier)
N3	E2	10 ⁻²	NOUMERAT
N4 a	E2	10 ⁻⁴	NOUMERAT
N4 b	E2	10 ⁻⁴	NOUMERAT
N5	E2	10 ⁻⁴	NOUMERAT
N6	E2	10 ⁻⁴	NOUMERAT
N7	E1	10 ⁻³	NOUMERAT
N11	E2	10 ⁻²	NOUMERAT
N13	S1	10 ⁻¹	SEBSEB
N15	E1	10 ⁻⁴	NOUMERAT
N17 a	E1	10 ⁻²	NOUMERAT
N18	E2	10 ⁻³	NOUMERAT
N19	E1	10 ⁻²	NOUMERAT
N20	E2	10 ⁻³	NOUMERAT

2.- Isolement des isolats susceptibles à dégrader le gasoil

L'ensemencement des 13 isolats sélectionnés sur milieu BH liquide additionné de 2% de gasoil brute comme source de carbone nous a permis d'isoler 8 isolats qui ont montré une capacité à dégrader le gasoil et qui ont formé une turbidité de croissance. Les résultats obtenus sont représentés dans la photo5.



Photo 5. Isolement des isolats susceptibles à dégrader le gasoil

3.- Caractérisation des isolats purifiés

3.1.- Résultats

3.1.1.- Aspect macroscopique

L'ensemencement sur milieu solide gélose nutritive nous a permis d'isoler treize colonies distinctes par leur aspect, leur taille et leur couleur, le temps d'adaptation diffère d'un isolat à un autre. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3 et photo 6.

Les colonies bactériennes obtenues sont généralement lisses, irrégulières et convexes.

Tableau 3. Aspect macroscopique des colonies isolées

Critère isolat	Diamètre (mm)	couleur	Forme	Elévation	Contour	Opacité	Surface
N3	1	Jaune marron	Punctiforme	convexe	irrégulière	Opaque	Lisse
N4 a	>1	blanc jaunâtre	Punctiforme	convexe	irrégulière	Opaque	Lisse
N4 b	7	Jaune marron	Lobé	convexe	irrégulière	Opaque	Lisse
N5	1	Jaune	Rond	convexe	régulière	Translucide	Lisse
N6	3	Marron Claire	Lobe	convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
N7	>1	Blanche	Rond	convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
N11	3	blanc jaunâtre	Dentelé	plat	irrégulière	Opaque	Lisse
N13	5	Jaune	Lobé	convexe	irrégulière	Opaque	Lisse
N15	>1	Blanche	Punctiforme	convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
N17 a	5	Jaune	Lobé	convexe	irrégulière	Opaque	Lisse
N18	2	Blanche	Lobé	plat	irrégulière	Opaque	Lisse
N19	>1	blanc jaunâtre	Punctiforme	convexe	irrégulière	Opaque	Lisse
N20	>1	Blanche	Punctiforme	convexe	régulière	Opaque	Lisse

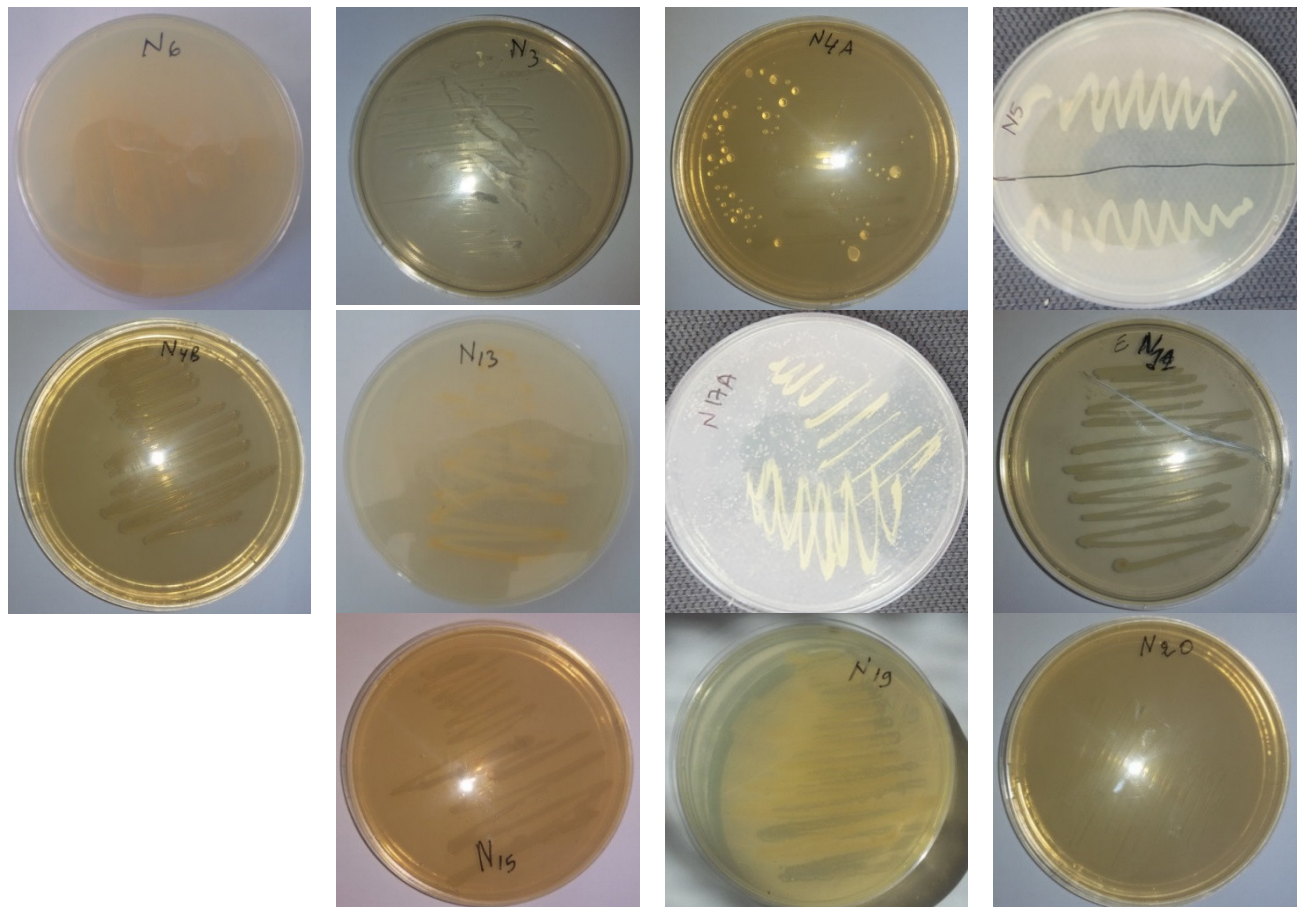


Photo 6. Aspect macroscopique des isolats sélectionnés. (Lahreche et Bouhamida, 2017)

3.1.2.-Etude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes, après une observation à l'état frais et après coloration de Gram et au bleu de méthylène. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4.Aspect microscopique des isolats sélectionnés

Etat frais		Coloration de Gram		Coloration au bleu de méthylène	
Colonies	Mobilité	Arrangement	Forme des cellules	Gram	Présence de spores
N3	-	I/P/C	Bacile	+	-
N4A	-	I/A	Coque	-	-
N4B	+	C	Petit Bacile	+	-
N5	+	I/A	Bacile	-	-
N6	-	I/P	Bacile	+	-
N7	-	I/A	Bacile	-	-
N11	-	I	Bacile	+	-
N13	+	I/A	Coque	+	-
N15	-	I/A	Coque	+	-
N17A	-	T/A	Coque	+	-
N18	+	I/C	Bacile	+	+
N19	-	C	Strepto bacille	+	-
N20	-	I/A	bacile	-	-

+ : Positive/présence/mobile A : En amas
 - : Négative/ absence/ immobile P : En paire
 I : Isolée C : En chaînette
 T : Tétrade

Les résultats consignés dans le tableau, montrent une variété des types bactériens. Les bactéries isolées sont généralement immobiles (9/13). Elles présentent différentes formes: bacille, coque ou streptobacille. Elles sont assemblées en différents arrangements soient Tétrade, en paire, en amas, en chainettes ou même isolées. Elles présentent aussi une paroi à Gram positif ou négatif. La coloration au bleu de méthylène a révélé la présence de spore uniquement chez la souche N18, les autres sont dépourvus.

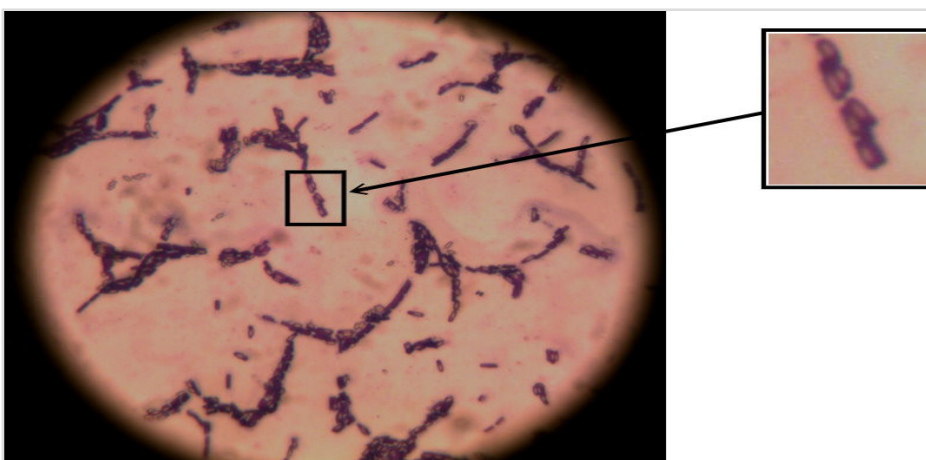
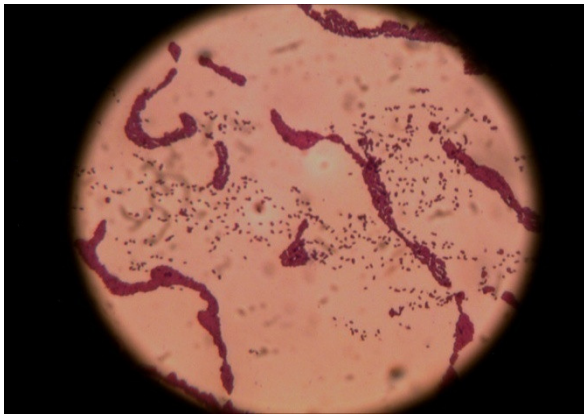
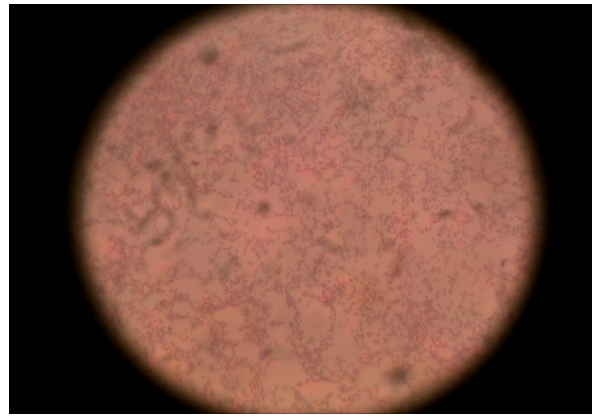


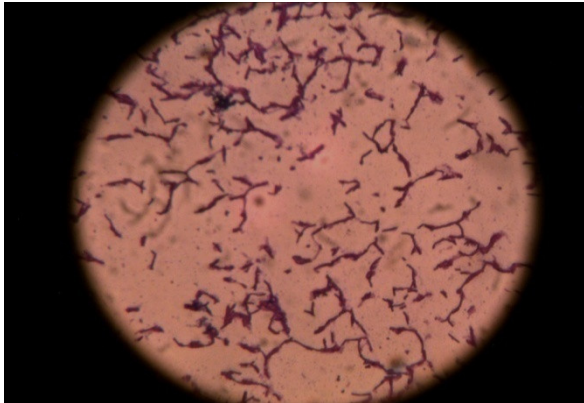
Photo 7. la présence des spores chez l'isolat N18 (Gx40). (Lahreche et Bouhamida, 2017).



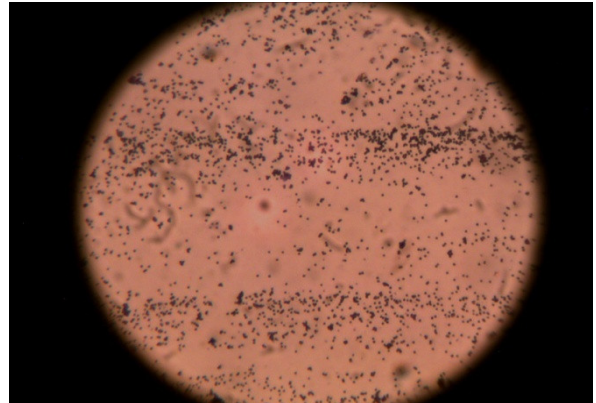
N4a



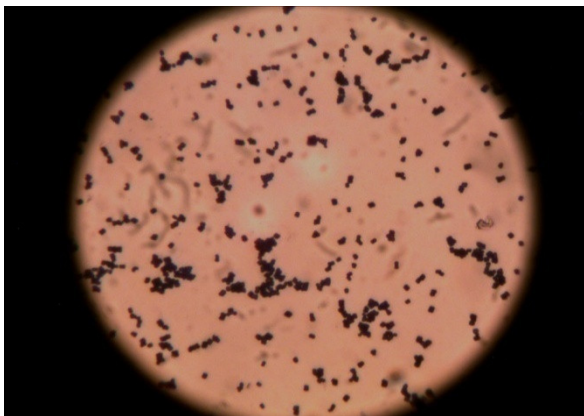
N5



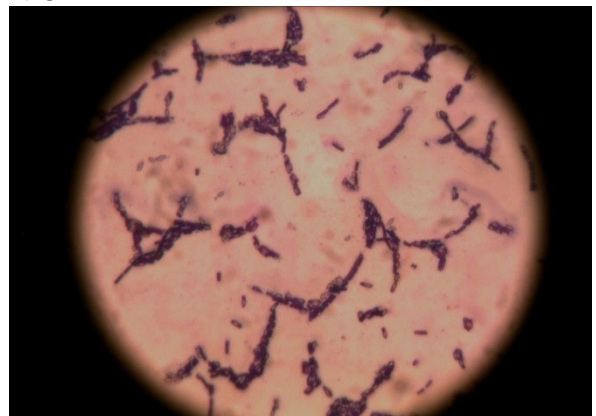
N11



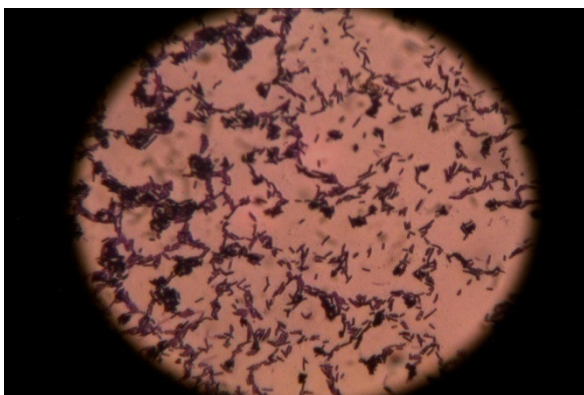
N13



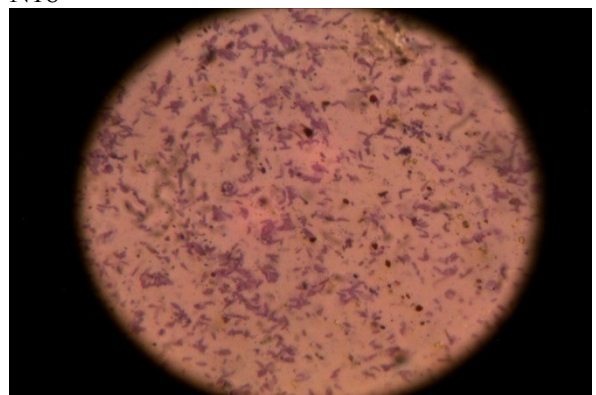
N17



N18



N19



N20

Photo 8.Aspect microscopique obtenu après la coloration de Gram (Gx40)

(Lahreche et Bouhamida, 2017).

3.2.- Discussion

Les résultats montrent que les isolats présentent une grande diversité entre eux. Selon **Dommergues (1977)**, Les bactéries du sol ont une grande variété de formes. Elles peuvent être mobiles ou immobiles, et posséder ou non des formes de résistance (spores, kystes). Il faut signaler que la plus part des bactéries sélectionnés sont à Gram positif. Selon **Vandercastele (2005)**, Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartenant aux genres à Gram positif.

4.- Utilisation des schémas d'identification des principaux groupes bactériens

4.1.- Résultats

Nous avons suivi une identification préliminaire pour les isolats sélectionnés en réalisant quelques tests d'orientation à savoir : la coloration de Gram, le test de catalase, le test d'oxydase et le test d'aérobiose (voir annexe). Les schémas ci-dessous nous permettent d'orienter l'identification préliminaire de nos souches en sélectionnant un nombre de caractères significatifs pour sélectionner la famille ou le genre (**Leyral et Joffin, 1998**).

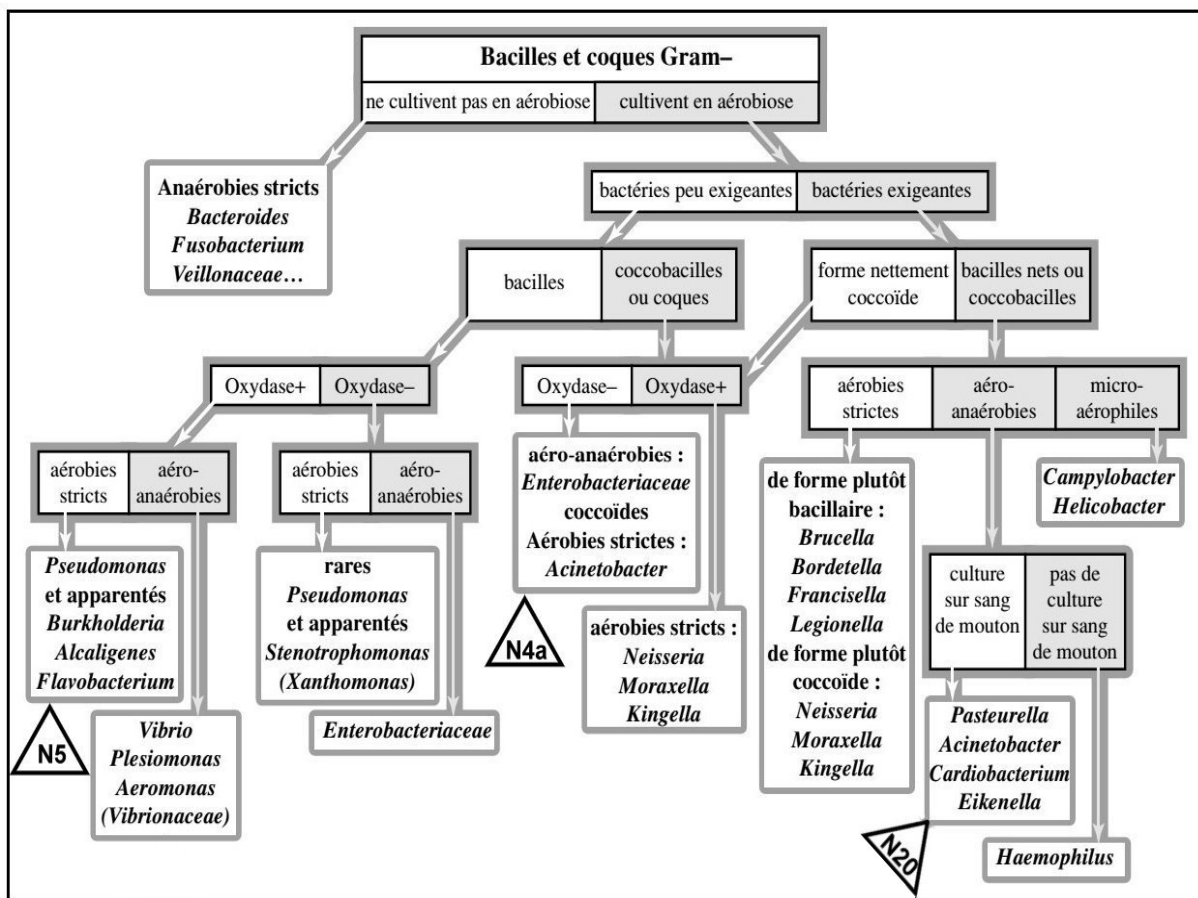


Figure 4. Orientation préliminaire d'identification des souches N5, N20 et N4a

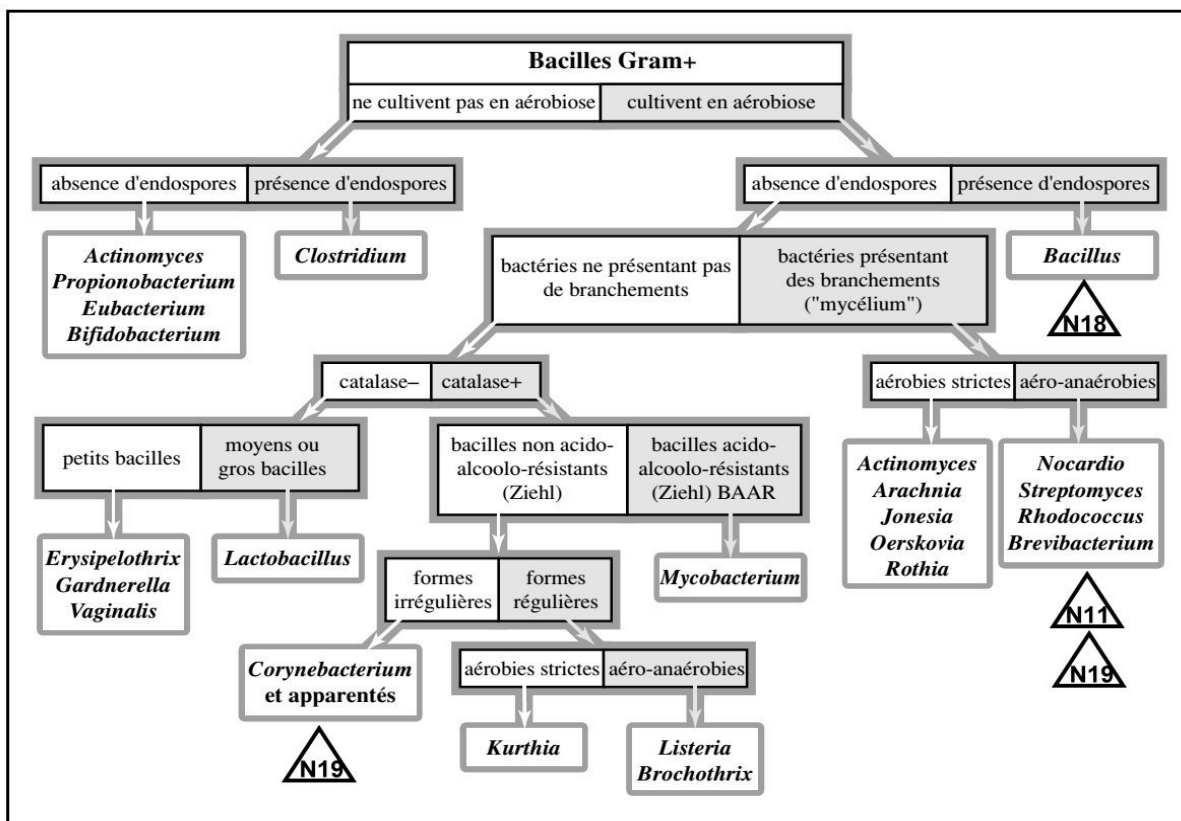


Figure 5. Orientation préliminaire d'identification des souches N18, N11 et N19

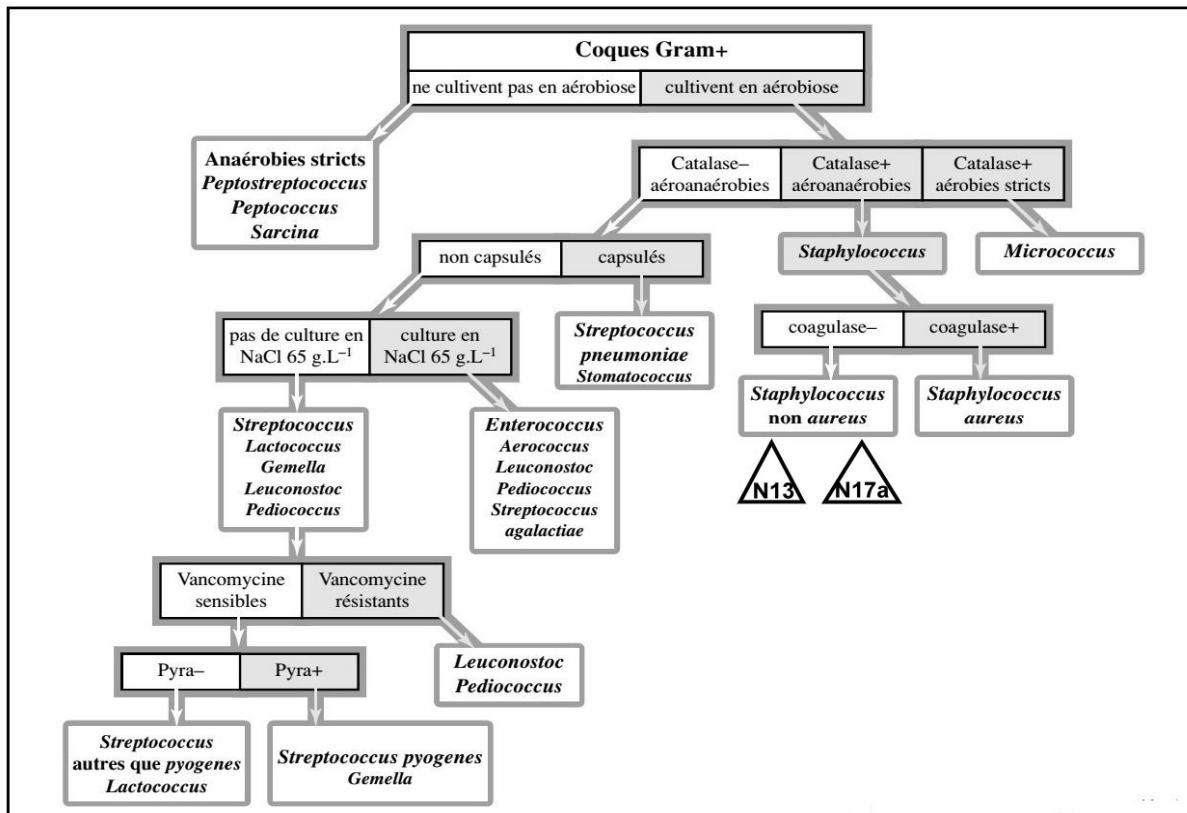


Figure 6. Orientation préliminaire d'identification des souches N13 et N17a

4.2.- Discussion

Le suivi des schémas d'identification dichotomique nous a permis de rapprocher nos isolats aux genres suivant à savoir: la souche N18 au genre *Bacillus*, la souche N5 aux genres *Pseudomonas* ou apparentés, les deux souches N20 et N4a au genre *Acinetobacter*, les souches N11 et N19 aux genres *Rhodococcus* ou *Brevibacterium* et les deux souches N13 et N17a au genre *Staphylococcus*. Ces genres font parties des genres bactériens hydrocarbonoclastes prédominants cités dans la littérature des bactéries hydrocarbonoclastes (Gaudu, 2014). D'après Jagadevan et Mukherji (2004), les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures font partie aux genres suivants: *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Acinetobacter* spp, *Rhodococcus* spp, *Brevibacillus* spp, *Micrococcus* spp. Selon Ballerini et Vandecastel (1996), nombreuses souches appartenant aux espèces biodégradantes des hydrocarbures ont été isolées et sont principalement des souches aérobies telles que: *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter cloaceticus*, *Mycobacterium* sp, *Rhodococcus* sp, *Staphylococcus auriculans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Beijerinckia* sp, *Alcaligenes denitrificans* et *Alcanivorax borkumensis*.

5.- Identification des souches sélectionnés

Le principe de l'identification de la galerie API est le même que celui de la méthode enzyme/substrat. Chaque cupule contient un substrat différent avec lequel chaque enzyme bactérienne réagit. Après une incubation à 37°C pendant 24 h, la lecture est effectuée à l'aide d'un catalogue analytique. En se basant sur les résultats des tests d'orientation, nous avons continué l'identification des huit souches par l'utilisation des galeries API selon le genre obtenu. Ainsi, nous avons choisi une galerie API 50 CHB (bioMérieux) pour la souche N18. Autres galeries API 20E et API 20NE ont été choisies pour les souches N5, N20, N4a, N11 et N19. Enfin des galeries API STAPH ont été choisies pour les deux souches N13 et N17a. Les résultats obtenus suite à l'identification sont présentés dans le tableau 5 et les photos en annexe.

Tableau 5. Identification biochimique des isolats sélectionnés.

TEST	Reaction enzyme	N4a	N5	N11	N13	N17a	N18	N19	N20
Type respiratoire		AS	AS	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF
Oxydase	Cytochrome-oxydase	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	Hydrolyse du peroxyde d'hydrogène	-	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	β -galactosidase (orthonitrophényl- β galactopyranosidase)	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-
ADH	Arginine dihydrolase	+	+	?	-	+	+	+	-
LDC	Lysine décarboxylase	ND	-	+	ND	ND	ND	+	-
ODC	Ornithine décarboxylase	ND	-	+	ND	ND	ND	-	-
CIT	Utilisation du citrate	ND	+	+	ND	ND	ND	+	+
H ₂ S	Production d'h ₂ s	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-
URE	Urease	-	-	-	-	-	+	-	-
TDA	Tryptophane désaminase	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-
TRP	Production d'indole	-	-	-	ND	ND	-	-	-
VP	Production d'acétoïne (vogesproskauer)	ND	-	ND	+	+	ND	ND	ND
GEL	Hydrolyse GELatine (Gélatinase)	-	-	+	ND	ND	+	+	+
GLU	Oxidation glucose	ND	+	-	+	+	ND	+	+
F / GLU	Fermentation glucose	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND
FRU	Assimilation Fructose	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
MNE	Assimilation D-mannose	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
MAL	Assimilation D-maltose	ND	ND	ND	+	-	ND	ND	ND
LAC	Assimilation Lactose	ND	ND	ND	+	-	ND	ND	ND
MAN	assimilation mannitol	ND	-	-	+	-	ND	-	-
TRE	assimilation D-tréhalose	ND	ND	ND	+	-	ND	ND	ND
INO	Oxidation inositol	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-
SOR	assimilation sorbitol	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-
RHA	assimilation rhamnose	ND	-	-	+	-	ND	-	-
SAC	assimilation saccharose	ND	-	-	+	-	ND	-	-
MEL	assimilation melibiose	ND	+	-	-	-	ND	-	-
XYL	Assimilation D-xylose	ND	ND	ND	-	+	ND	ND	ND
XLT	Assimilation Xylitol	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
AMY	assimilation amygdaline	ND	-	-	ND	ND		-	-
ARA	assimilation arabinose	-	-	-	ND	ND	-	-	-
MDG	Méthyl-ddglucopyranoside	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
NAG	N-acétyl-glucosamine	ND	ND	ND	+	-	ND	ND	ND
NO3	Réduction des nitrates en nitrites	-	ND	+	-	+	+	ND	ND
ESC	Hydrolyse (β -glucosidase) (ESculin)	-	ND	+	ND	ND	+	ND	ND
PNPG	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D-Galactopyranosidase)	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND

Note : + : Test positif - : Test négatif ND: Non Déterminé ;

5.1.- Utilisation d'ABIS en ligne

5.1.1.- Resultats

Finalement, la sélection du taxon le plus proche a été faite à l'aide de l'outil de laboratoire pour l'identification bactérienne « ABIS online-bacterial identification software » (Costin Stoica et Sorescu Ionut, 2015). Les huit bactéries isolées ont été rapprochées aux espèces consignées dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6. Identification des souches à l'aide d'ABIS online -Bacterial identification.

Souche	Taxon le plus proche	% ID
N4a	<i>Acinetobacter baumannii</i>	87%
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	87%
	<i>Acinetobacter junii</i>	87%
	<i>Acinetobacter rudis</i>	87%
N5	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99%
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	89%
	<i>Pseudomonas putida</i>	89%
	<i>Pseudomonas fragi</i>	88%
N11	<i>Brevibacterium iodinum</i>	90%
	<i>Brevibacterium linens</i>	89%
	<i>Brevibacterium avium</i>	87%
	<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	69%
N13	<i>Staphylococcus arlettae</i>	78%
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	76%
	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	72%
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	72%
N17a	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	93%
	<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	88%
	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	88%
	<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	88%
N18	<i>Bacillus filicolonicus</i>	99%
	<i>Bacillus licheniformis</i>	97%
	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	84%
	<i>Paenibacillus macerans</i>	78%
N19	<i>Brevibacterium iodinum</i>	99%
	<i>Brevibacterium linens</i>	98%
	<i>Brevibacterium avium</i>	93%
	<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	77%
N20	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	87%
	<i>Moraxella bovis</i>	86%
	<i>Moraxella pluranimalium</i>	86%
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	85%

% ID : Pourcentage d'identification

5.1.2.- Discussion

Les résultats obtenus montrent que la souche N4a est proche de l'espèce *Acinetobacter baumannii*. Il est à rappeler qu'une souche bactérienne appartenant à cette espèce ayant la capacité de dégrader le gazoil a été isolée et identifiée par **(Nkemet *et al.*, 2016)**. La souche N5 se rapproche de l'espèce *Pseudomonas mendocina*. Cette espèce est connue par sa dégradation de trichloroéthylène qui est présent en tant que polluant ou contaminant de l'eau **(Rebert *et al.*, 1989)**. Les souches N11 et N19 se rapprochent de l'espèce *Brevibacterium iodinum* qui peut faire la biodégradation des phénols **(Kafilzadeh et Mokhtari, 2013)**. La souche N13 est proche de l'espèce *Staphylococcus arlettae*. Cette espèce est connue pour sa biodégradation des colorants azoïques des textiles **(Fransiconet *et al.*, 2009)**. La souche N17a est proche de *Staphylococcus schleiferi*. Selon **Igwo-Ezikpe *et al.* (2010)**, cette espèce peut dégrader les naphthalènes. La souche N18 se rapproche de *Bacillus filicolonicus*. Une étude réalisée par **(Hassan et Jasim, 2016)** porte sur l'isolement des bactéries à partir des sols pollués par gazoil. Ils ont trouvé parmi les souches isolées, une souche appartenant à cette espèce. Enfin la souche N20 est proche de *Acinetobacter haemolyticus*. Il faut signaler que cette espèce ayant la capacité de dégrader plusieurs composés d'hydrocarbures **(Lima *et al.*, 2011)**, produisant des biosurfactants **(Chen *et al.*, 2012)**.

Des travaux entamés par d'autres auteurs au niveau national permettent d'isoler quelques genres hydrocarbonoclastes des champs de forage; par exemple les résultats d'isolement bactérien de **Khodja (2008)**. Ce dernier a pu isoler *Enterobacter*.sp, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus auricularis* à partir des échantillons obtenus de chantier de forage du champ de Hassi Messaoud. **Akmouci (2009)**, a mis en évidence l'existence de *Pseudomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus varians*, *Bacillus* sp dans un borbier contaminé par les fluides de forage du champ de Hassi Messaoud. Et d'un borbier de forage situé à Teguentour Ain saleh, **Elmoun et Benkhebeche (2016)**, ont pu isoler des espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*.

6.- Index d'émulsification E24

6.1.- Résultats

Afin de confirmer et d'estimer la production de biosurfactants par les souches sélectionnées, nous avons réalisé le test d'émulsification qui consiste à mélanger 3 ml de culture bactérienne avec 2 ml de gasoil (60/40 v/v). Les résultats nous montrent qu'il existe 5 souches bactériennes ayant la capacité de produire des biosurfactants avec un degré plus élevé pour les 3 souches N18, N20 et N4a. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7, figures 7 et photo 9.

Tableau 7. Calcul de l'index d'émulsion sur le gasoil.

Souche	Longueur de la couche émulsifiée (cm)	Index (E24)	Stabilisation après 15 jours
N4a	0.9	12.85	12.85
N5	0.2	0.20	0.20
N11	0	0.00	0.00
N13	0	0.00	0.00
N17a	0	0.00	0.00
N18	3.1	44.28	44.28
N19	0.5	0.5	0.5
N20	1	14.28	14.28

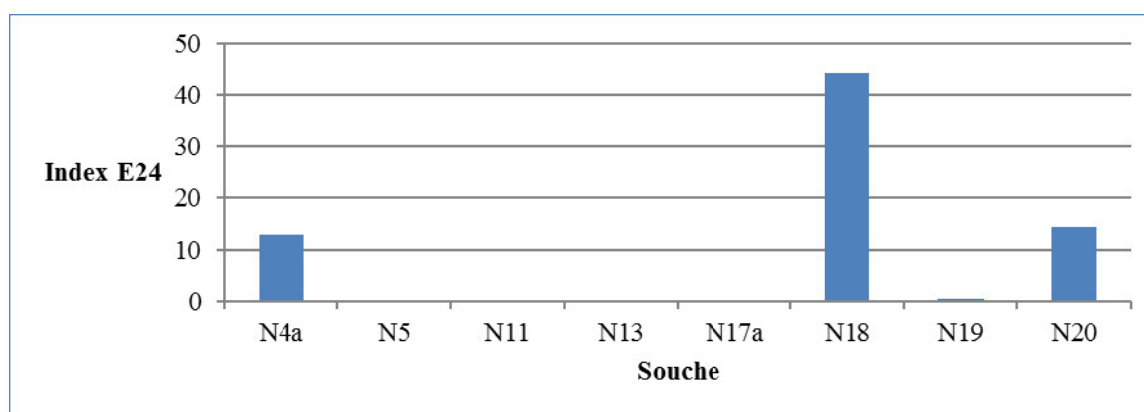


Figure 7. Index d'émulsion E24 pour les souches étudiées

La valeur la plus élevée est obtenue avec la souche N18 (44,28%). Suivie par les deux souches N20 et N4a avec un index d'émulsion 14,28 % et 12,85 % respectivement. Les souches N5 et N19 ont présenté une faible capacité de produire des biosurfactants. Alors, les souches qui restent présentant des valeurs nulles d'émulsification.

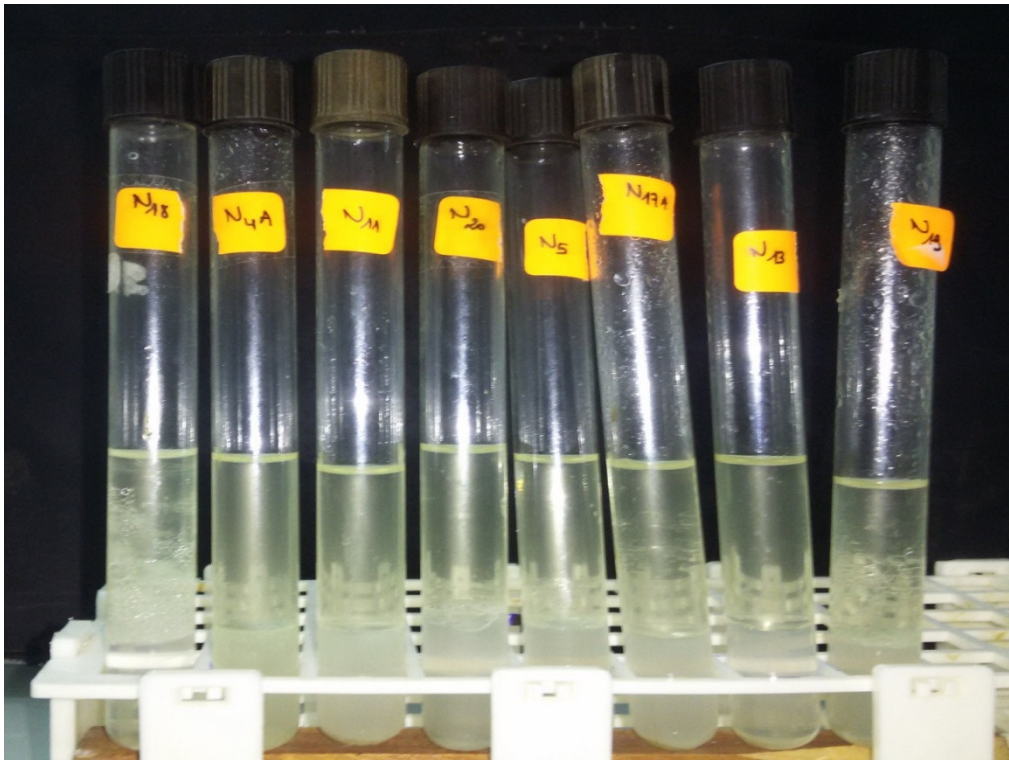


Photo9.Capacité de production des biosurfactants par les souches sélectionnées

6.2.- Discussion

D'après les résultats obtenus, il en ressort que la souche N18 produit la plus grande quantité des biosurfactants avec un index d'émulsification de 42,28 %. Cette observation nous indique que cette souche présente un intérêt industriel certain et important grâce à la production de ces composés à activité émulsifiante. D'après **Priya et Usharan (2009)**, *Bacillus* sp. produit des rhamnolipid qui présentent un rôle dans la bioremédiation. **Rodríguez-Rodríguez et al. (2012)** ont rapporté qu'un E24 > 50% indique que le microorganisme produit potentiellement des biosurfactants. Néanmoins, il faut tenir compte les conditions optimales pour la productivité maximale des biosurfactants. **Mouafiet al. (2016)** ont augmenté la valeur d'E24 d'un *bacillus* sp. Jusqu'à 79,96% par modification des conditions physico-chimique (température d'incubation 33°C, pH 8 et période d'incubation 10 jours).

Rodríguez-Rodríguez et al. (2012) identifient cinq souches différentes de *Bacillus* sp. avec des E24 compris entre 0 et 62 %. Aussi, **Nisha et al. (2016)** identifient une souche *Bacillus* sp. Avec un E24 de 52.38%. **Priya et Usharan (2009)** identifient quatre souches *Bacillus* sp. ayant un E24 compris entre 50 et 60%.

7.- Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées

7.1.- Résultats

Dans l'objectif d'isoler des souches bactériennes ayant une capacité de biodégradation performante envers le gasoil, les deux souches N18 et N20 ont été choisis pour la suite des travaux. Ce choix est basé sur les résultats issus de test d'émulsification qui est un indicateur de production de biosurfactant. Ainsi que, la turbidité remarquée qui est un indicateur de croissance.

Les souches retenues ont fait l'objet d'une suivie de cinétique de leurs croissance dans le milieu BH additionné de 2 % (v/v) de gasoil comme seul source de carbone en suivant la croissance microbienne en fonction du temps de culture en mesurant l'absorbance du milieu de culture chaque 12 heures à 600 nm en utilisant un spectrophotomètre à UV, ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées dans les figures suivantes.

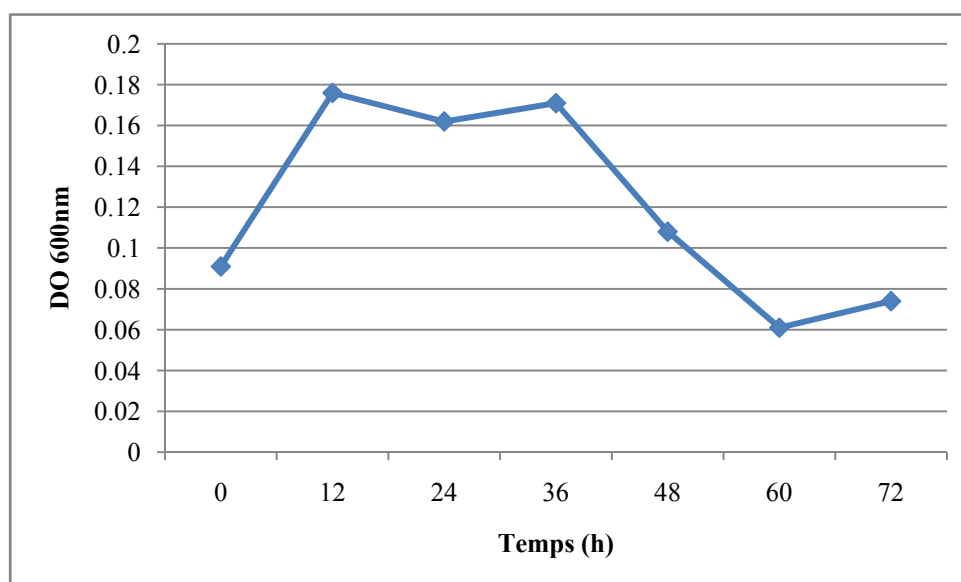


Figure 8. Cinétique de croissance de la souche N18 dans le milieu BH avec 2 % de gasoil

Le début de croissance de la souche N18 est mesuré par une turbidité initiale $DO = 0,9$. La phase de latence est absente. Ceci peut être lié à l'âge des bactéries d'une part et d'autre part à leur adaptation aux sources de carbone contenues dans le milieu BH. Sachant que la souche a été ensemencée auparavant dans une préculture en utilisant le même milieu. Quand une jeune culture en phase de croissance exponentielle transférée dans un milieu frais de même composition, la phase de latence est courte ou absente (**Lansing, 2010**). Nous aurions dû faire la mesure de croissance par heure mais les conditions de travail au niveau de laboratoire nous ont empêchées. Au bout de 12 heures, on observe une augmentation de la croissance exprimée par une phase exponentielle atteinte une maximale croissance, c'est la phase où la croissance bactérienne et la consommation du gasoil est maximale, cette augmentation ralentie de 12 jusqu'à 36 heures. Cette période correspond à la phase stationnaire. La valeur de turbidité durant cette phase presque stable. Au-delà de 36 heures

on assiste à une diminution continue de la densité optique, c'est la phase de déclin ; elle est caractérisée par la mort cellulaire due à l'épuisement du substrat et à l'accumulation de substances toxiques dans le milieu de culture.

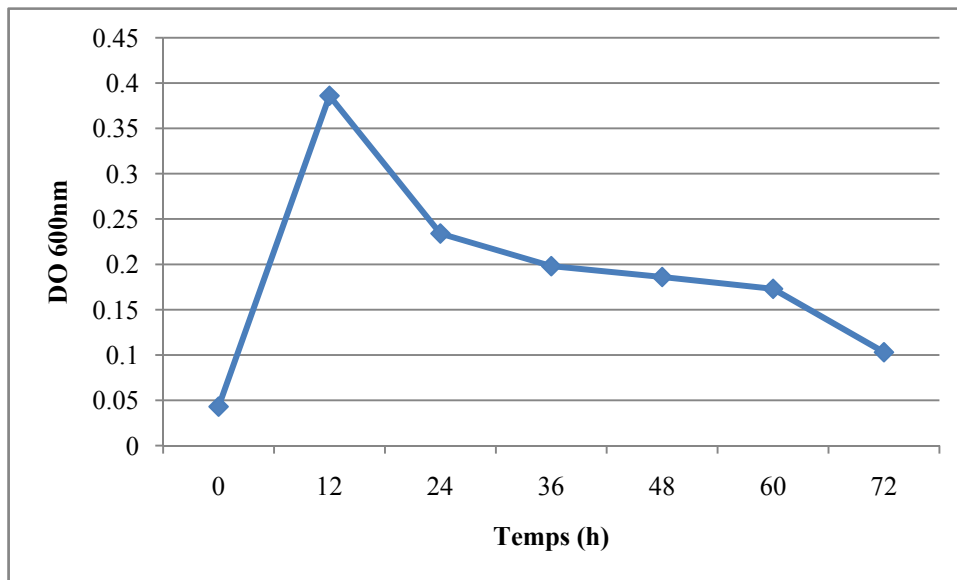


Figure 9. Cinétique de croissance de la souche N20 dans le milieu BH avec 2 % de gasoil

En ce qui concerne la souche N20 d'après la figure 9, la DO augmente dès les premières heures jusqu'à atteindre une valeur maximale; cette augmentation correspond à la phase exponentielle, c'est la phase où la croissance bactérienne, qui est expliquée par l'assimilation des composés complexe de gasoil dissous dans le milieu minéral. La phase stationnaire est presque absente, ceci peut-être expliqué par l'implicite de cette phase dans la première phase car nous n'avons pas fait une cinétique par heure. A partir de la 12e heure, on assiste à une diminution continue de la densité optique, c'est la phase de déclin.

7.2.- Discussion

Le suivi de la cinétique de croissance de la souche N18 dans le milieu BH avec 2 % de gasoil a révélé que cette souche capable d'utiliser le diesel pour sa croissance, qui commence par une phase exponentielle atteinte le maximale au bout de 12 heures, (la phase de latence est courte ou absente), puis la phase stationnaire ou l'augmentation est ralentie de 12 jusqu'à 36 heures, finalement la phase de déclin au-delà de 36 heures on assiste à une diminution continue de la densité optique, c'est la phase de déclin. **Prakash et al. (2014)** ont observé une situation semblable en suivant la croissance de la souche *bacillus* sp. ou la phase stationnaire atteint au bout de 39 heures, suivi par un déclin, mais **Kaushishet al. (2012)** note que la biomasse d'un *bacillus* sp. augmente exponentiellement pendant 3 jours, et reste stable jusqu'à 21 jours.

Le suivie de cinétique de croissance de la souche N20 dans le milieu BH avec 2 % de gasoil a révélé que cette souche possède la capacité d'utiliser le diesel pour sa croissance, qui commence par une phase exponentielle atteinte un maximale croissance au bout de 12 heures, (la phase stationnaire est courte ou absente), puis la phase de déclin Au-delà de 12 heures ou nous assistons à une diminution continue de la densité optique. Dans des conditions similaires, **Khelilet al. (2014)** ont isolé *Acinetobacter* sp. d'une zone portuaire appartenant à une société des hydrocarbures. La croissance de cette souche atteinte le max de sa phase exponentielle après 24 heures d'incubation, et une phase stationnaire dure 24 heures, au-delà 48 heures une phase de déclin a été enregistrée. **Kulkarni (2014)**, a fait une culture d'*Acinetobacter baumannii* qui utilise le gasoil comme seule source de carbone, et a montré l'augmentation du nombre de cellules de 2×10^7 ufc/ml à $8,7 \times 10^9$ UFC/ml après sept jours. **Halmi et al. (2014)** trouvent que la croissance d'*Acinetobacter* sp. Souche DRY12 atteinte son maximum à 10 jours sur concentrations de 2% de gasoil.

8.- Etude de l'optimum du pH

8.1.-Resultats

L'effet du pH sur la croissance de la souche N18 avec du gasoil a montré une croissance maximale au pH 12. La croissance bactérienne a diminué tout en diminuant le pH (figure 10).

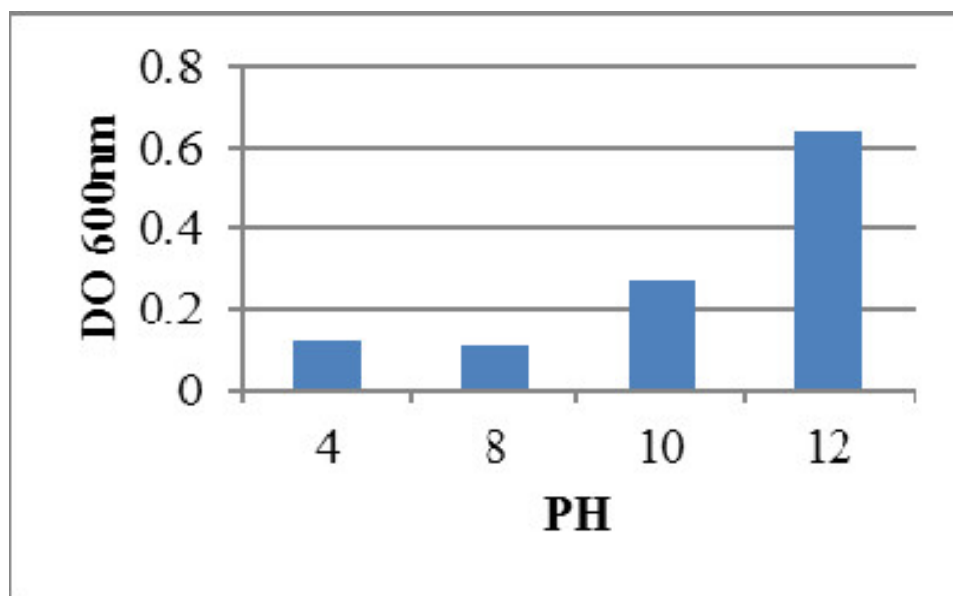


Figure10.Effet du pH sur la croissance de la souche N18 utilisant du gasoil à 30°C.

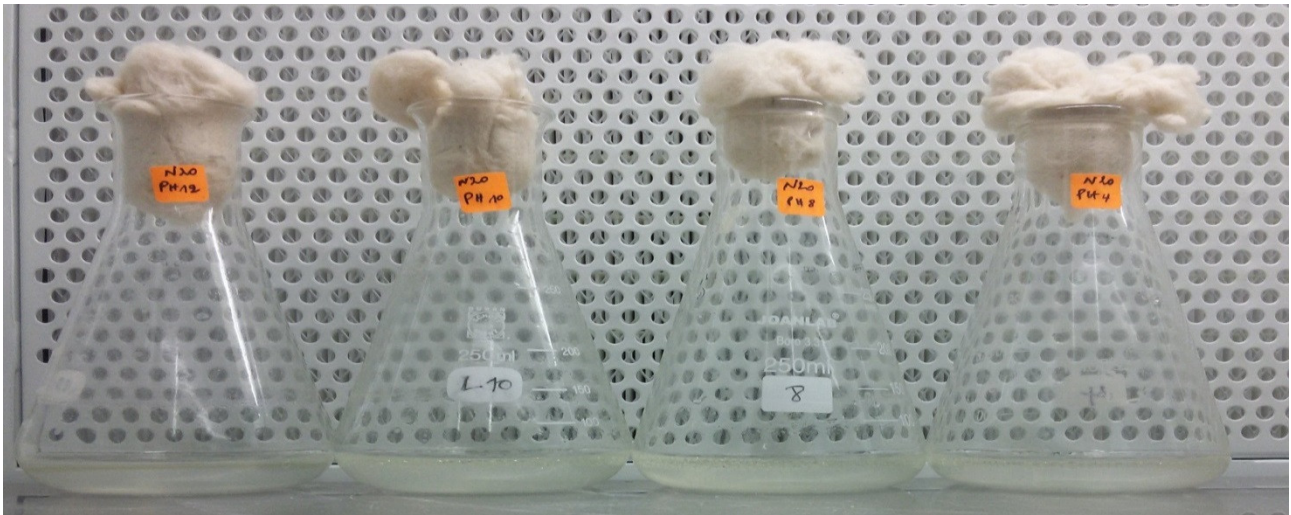


Photo 10. Croissance de la souche N18 à différents pH dans le milieu BH contenant 2% de gasoil.

La figure 11 montre la croissance de la souche N20 à différents pH dans le milieu BH contenant 2% de gasoil.

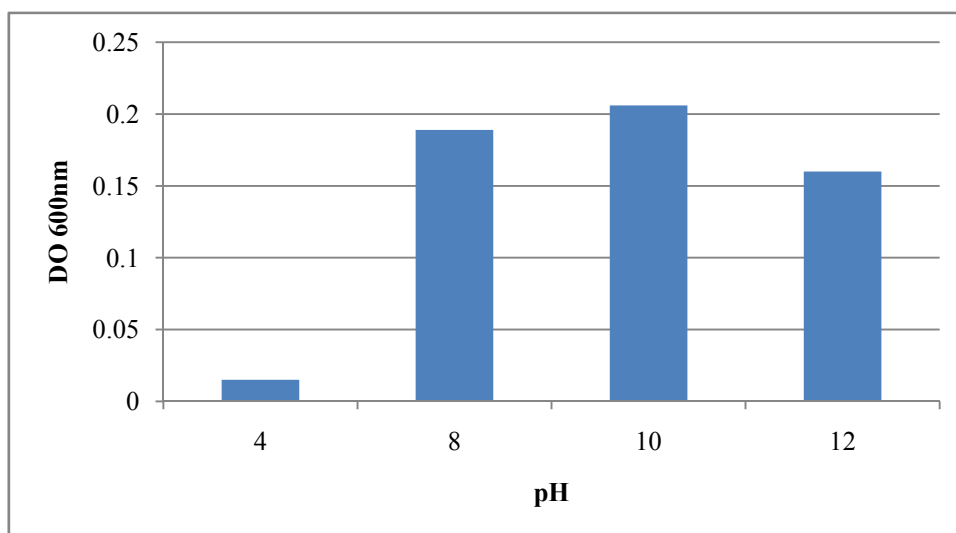


Figure 11. Effet du pH pour la croissance de la souche N20 utilisant du gasoil à 30°C.

L'effet du pH pour la croissance de la souche N20 avec du gasoil a montré une croissance maximale dans le pH 10. La croissance bactérienne a diminué tout en diminuant ou en augmentant le pH.

8.2.- Discussion

Le pH qui a permis une croissance optimale de la souche N18, était le pH 12. **O'Leary (1989)** note que le pH 7 est le pH optimal de croissance de la plupart des espèces du genre *Bacillus*. Néanmoins, il y a des espèces qui favorise un pH entre 9 et 12 comme *Bacillus alcalophilus* (**Lewis et al., 1981**).

Le pH qui a maintenu une croissance optimal de la souche N20 était le pH 10, Nos résultats sont presque en accord avec ceux de **Nandhini *et al.* (2014)**, qui ont trouvé que le pH optimum de croissance d'*Acinetobacter baumannii* avec 1% de gasoil c'était entre 7 et 8.

9.- Etude de l'optimum de température

9.1.-Résultats

Nous avons constaté que la température est un facteur important qui affecte le potentiel de dégradation du gasoil par les bactéries. En effet la température optimale de croissance de la souche N18 et N20 dans le milieu BH additionné de 2 % (v / v) de gasoil comme seul source de carbone a été évaluée et trouvée maximale à 30°C. La croissance minimale a été observée à 37.5°C.

Les figures 12 et 13 montrent la croissance des souches N18 et N20 à différentes températures dans le milieu BH additionné de 2 % de gasoil.

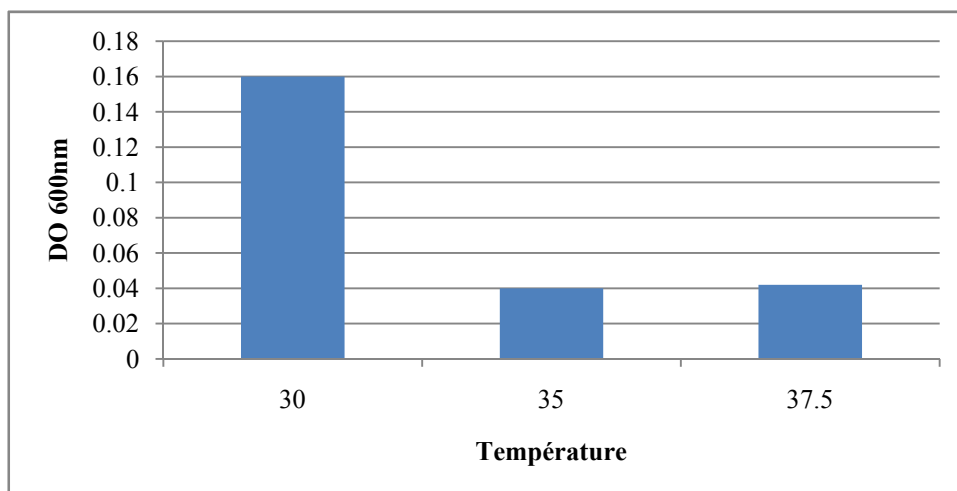


Figure 12. Effet de température sur la croissance de la souche N18 utilisant du gasoil à 30°C.

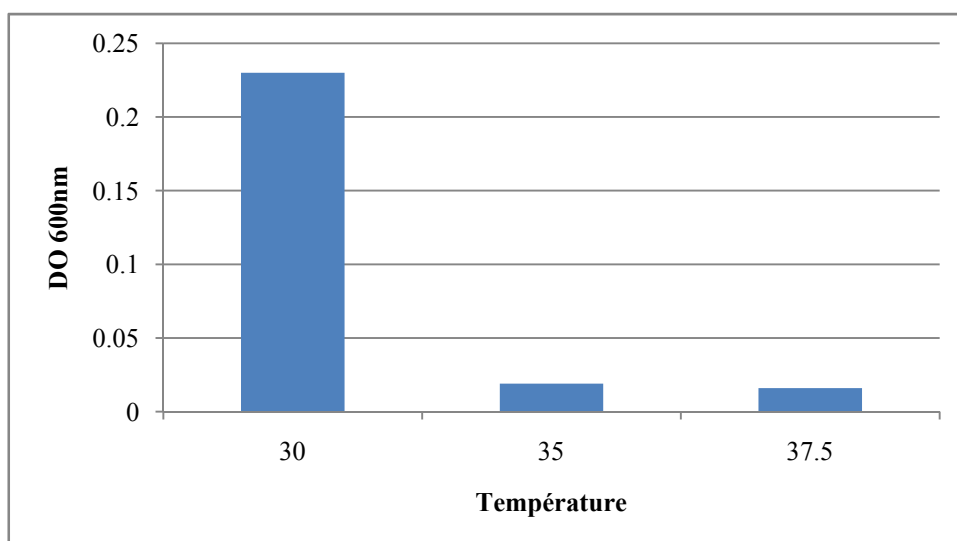


Figure 13. Effet de température sur la croissance de la souche N20 utilisant du gasoil à 30°C.

9.2.- Discussion

Dans la présente étude, nous avons constaté que la température optimale pour une croissance maximale des deux souches N18 et N20 c'est à 30°C, ce qui est en accord avec les résultats de **Mnifet al. (2013)**, qui ont constaté que 30°C était la température optimale pour la dégradation du diesel par *Bacillus subtilis* SPB1. Aussi, (**Priya et Usharani, 2009**) ont rapporté que *Bacillus subtilis* montre un meilleur taux de croissance à 37 °C. **Palanisamy et al. (2014)** ont constaté que la température optimale pour que la dégradation du gasoil par *Acinetobacter baumannii* atteinte son maximum est 35 °C. Les travaux de **Dahalan et al. (2014)** sur une souche *Acinetobacter* DRY12 démontrent que la biodégradation optimale des hydrocarbures a été observée en culture pure autour de 30 à 35°C. **Das et Chandran (2010)**, ont rapporté que dans le sol, la dégradation d'un hydrocarbure par les bactéries atteinte le maximum dans une gamme de température entre 30 et 40 °C.

10.- Tolérance des souches au gasoil

10.1.- Résultats

Des concentrations initiales en gasoil de 5 à 20% ont été utilisées pour étudier l'effet de concentration initiale de gasoil sur la croissance des souches N18 et N20 dans le milieu BH à une température de 30°C et pH 7 pendant 48 heures.

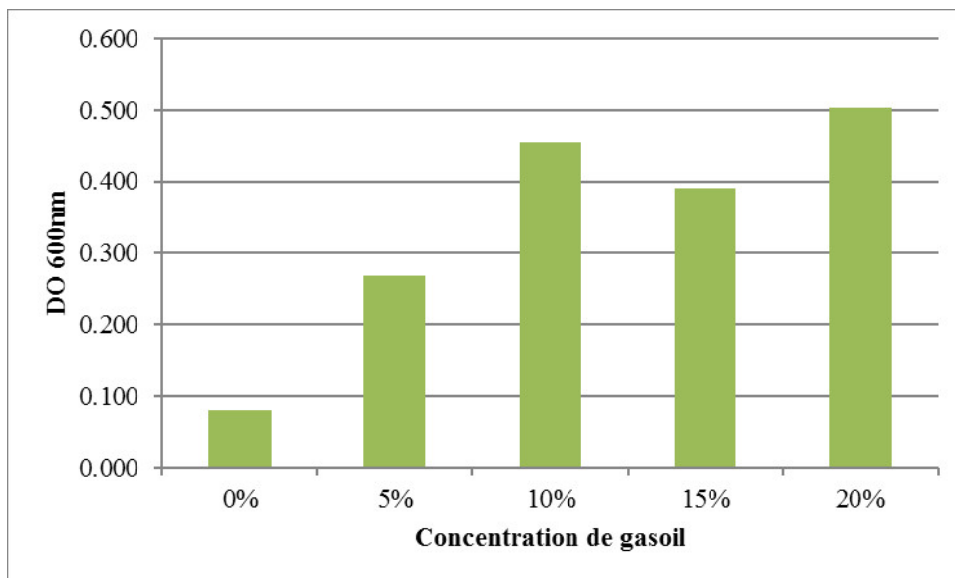


Figure 14. Effet de la concentration initiale de gasoil sur la croissance de N18 à pH 7 et 30 °C.

Concernant la souche N18, une croissance maximale a été observée dans une concentration initiale de 20 % comme le montre la figure14. La croissance bactérienne minimale a été observée dans une concentration initiale de 5%.



Photo11. Croissance de la souche N18 à différentes concentrations initiales en gazoil dans le milieu BH.

Concernant la souche N20, une croissance maximale a été observée dans une concentration initiale de 10% comme le montre la figure 15. La croissance bactérienne minimale a été observée dans une concentration initiale de 20 %.

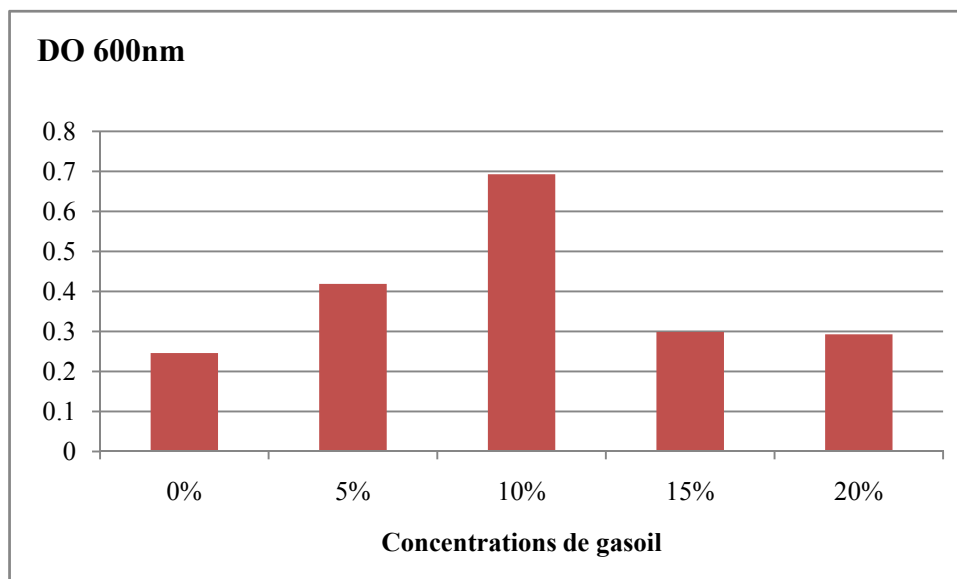


Figure 15. Effet de la concentration initiale de gazoil sur la croissance de N20 à pH 7 et 30 °C.

10.2.- Discussion

Des concentrations de gazoil variant de 0 à 20% (v/v) ont été testées pour la tolérance des souches N18 et N20 aux fortes concentrations du gazoil. Nous avons remarqué que la souche N18 supportent jusqu'à 20% de gazoil, où son optimum de croissance, et la viabilité des cellules diminue

tout en diminuant la concentration de gasoil. **Babalola et al. (2016)** ont publié un travail récent montre que *Bacillus* sp. a une bonne tolérance à 20% de concentrations de pétrole brut et de gasoil. Ce qui conforte les résultats obtenus de l'étude de l'influence du gasoil sur la croissance de souche N18 du genre *Bacillus* sporulé (Photo 7) démontrant une tolérance au gasoil à 20% (v/v). **Singh et Lin (2007)** ont rapportés que *Bacillus* spp était le genre le prédominant de toutes les bactéries qui utilisent le pétrole brut et identifiées dans des échantillons de sol hautement pollués (30 et 40% de pétrole brut). Ce qui indique que les *Bacillus* spp sont les plus tolérants aux niveaux élevés d'hydrocarbures dans le sol en raison de leurs endospores résistantes.

D'autre part, nous avons remarqué que la souche N20 a une croissance maximale à 10% de gasoil, et la viabilité des cellules diminue tout on diminuant ou on augmentant la concentration de gasoil. Ce résultat ne conforme pas à ceux rapportés par les auteurs. Les travaux de **Dahalan et al. (2014)**, sur une souche *Acinetobacter*DRY12 démontrent que la biodégradation optimale des hydrocarbures a été observée en culture pure autour de 4 à 6% de gasoil, et capable de tolérer plus que 8%. **Palanisamy et al. (2014)** ont rapporté que la concentration de gasoil optimale pour que la dégradation du gasoil par *Acinetobacter baumannii* atteinte son maximum est 4%. **Pratiwi et Harmin (2016)** ont rapportés que la concentration de 10% (v / v) de diesel peut être considéré comme une concentration élevée en hydrocarbures, avec une toxicité potentielle vis-à-vis de la plupart des microorganismes, mais les isolats purifiés par cette étude, devraient tolérer des concentrations élevées en hydrocarbures et leur toxicité potentielle, par ce que à une certaine concentration, le gasoil peut être toxique pour les microorganismes en raison de l'effet solvant qui détruit la membrane cellulaire

Aussi, on note que les deux souches testés n'ont pas la même tolérance au gasoil, ceci peut être expliqué par le différent arsenal enzymatiques que possède chaque souche ainsi que leurs modes de fonctionnement sur les différents types d'hydrocarbures qui composent le contaminant (**Khelil, 2015**).

Les résultats sont conformes à ceux rapportés par **Khelil (2015)** qui avancent que les bactéries isolées d'une région contaminée d'une façon chronique par les hydrocarbures (bourbier de forage pétrolier) supportent des concentrations considérables d'hydrocarbures, parce que dans les zones polluées par ces derniers, des mécanismes d'induction des enzymes d'intérêt dans sa biodégradation ont été retrouvés, et les bactéries ont la capacité de répondre plus rapidement aux nouvelles sources d'hydrocarbures que les bactéries trouvés dans des régions dépourvues de contamination.

Conclusion
et
perspectives

Le problème majeur dans les opérations de forage pétroliers est l'utilisation de boue de forage à base d'huile, qui relatif à la pollution engendrée. En terme quantitatif, le gasoil est un des polluants organiques le plus répandu dans les champs de forage du fait de la concentration importante utilisée. En effet, le nombre important de sites pollués suite aux opérations de forages, constitue depuis quelques années un souci majeur pour la santé humaine, l'écosystème et l'environnement. Le diagnostic des techniques de traitement utilisées depuis plus d'une quinzaine d'années a montré des imperfections majeures (**Khodja, 2008**).

L'objectif de notre étude est de contribuer à isoler a partir de sols contaminés par les hydrocarbures, des bactéries autochtones possédant des traits très intéressants pour un éventuel recours à une biodégradation des polluants organiques dans les sols contaminés par les rejets inhérents à l'activité de forage.

La première partie de l'étude s'est intéressée à l'isolement et la caractérisation des isolats sur gélose nutritive et de sélectionner entre eux les hydrocarbonoclastes performantes dégradant de gasoil par culture des souches dans le milieu liquide Bushnell Haas additionné de gasoil comme seule source de carbone et surveiller la turbidité de milieu, puis identifier morphologiquement et biochimiquement les isolats sélectionnés.

La seconde partie de l'étude s'est intéressée à tester l'activité d'émulsification qui nous permet d'estimer la production de biosurfactants par les isolats sélectionnés et d'optimiser les conditions de croissance bactériennes des souches sélectionnées dans le milieu Bushnell Haas additionné de gasoil comme seule source de carbone. Pour cela, nous avons procédé à l'étude de l'effet du pH, de température et la concentration de gasoil initiale sur la croissance bactérien.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus se résume ainsi:

Nous avons pu isoler un nombre faible à partir de tous les échantillons utilisés, au total 20 isolats ont été observés sur l'ensemble des boites d'isolement. On se basant sur des critères morphologiques nous avons sélectionnées 13 isolats. Ces derniers ont été l'objet d'une étude macro et micromorphologique. Le suivi de la turbidité sur milieu Bushnell Haas, nous a permis de trouver huit isolats ayant une activité hydrocarbonoclaste.

En se basant sur leurs caractères macroscopiques, microscopiques, biochimiques et physiologiques, nous avons pu rapprocher les huit souches bactériennes aux genres suivant: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Brevibacterium*.

Les résultats de test d'émulsification nous ont permis de suggérer qu'il y a eu une production de biomolécules ayant des propriétés tensio-actives confirmés par les index d'émulsion (E24). Ainsi,

nous avons sélectionné pour la suite des travaux, les 2 souches ayant montré la plus grande capacité d'émulsification, la souche N18 avec un index de 42,28 % et la souche N20 avec un index de 14,28 %.

Ces souches ont été rapprochées aux genres *Bacillus* et *Acinetobacter* successivement.

La cinétique de croissance a montré une croissance maximale au bout de 12h d'incubation pour les deux souches. L'étude de l'influence du pH sur la croissance a révélé un pH optimum de 12 pour la souche N18 et 10 pour la souche N20. L'étude de l'influence de température sur la croissance indique une température optimale de croissance 30°C pour les deux souches.

La tolérance à la concentration initiale de gasoil atteinte 20% pour la souche N18, et 10% pour la souche N20.

A la lumière des résultats obtenus de cette étude, il est recommandé de :

- Caractériser les biosurfactants produits par la souche N18.
- Réaliser une étude sur la cinétique de dégradation de quelques uns des principaux constituants. du gasoil, par la souche N18.
- L'identification moléculaire des souches microbiennes responsables de cette biodégradation.
- Envisager un éventuel recours à une culture mixte, avec un test à l'échelle du laboratoire.

Références

Bibliographiques

- Akmouci S. (2009). Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Thèse Magister, Université Mohamed Bougara, Boumerdes.
- Al-Araji L., Abd Rahman R., Basri M., et Salleh A.B. (2007). Mini review Microbial Surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 15 (3) : 99-105.
- Albaigés J. (1983). *Chemistry and Analysis of Hydrocarbons in the Environment*. Edition Gordon and Breach Science Publishers.
- ATLAS R. M. (2005). *Atlas Handbook of Media for Environmental Microbiology*. 2^e éd. Taylor & Francis Group.
- Ayadim M. (2014). *Chimie organique structurale: Manipuler les molécules pour les comprendre*. Presses universitaires de Louvain.
- Babalola T. A., Sylvester P. A. et Dominic R. T. (2016). Toxicity of Crude Oil and Diesel Fuel to Some Gram Positive and Gram Negative Bacterial. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research* 2 (12): 273-283.
- Ballerini D., et Vandecasteele J. P. (1996). La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. *In biotechnol.* 23: 836-865.
- Bekenniche N. (2014). Caractérisation des activités de biodégradation des hydrocarbures par différents genre microbiens isolés de sites contaminés. Thèse Magister, Université d'Oran.
- Bidaud C. (1998). Biodegradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un Sol Pollué. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Grenoble et de l'école nationale supérieure des mines de saint-étienne, France.
- Bouderhem A. (2011). Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Thèse magister, Université KasdiMerbah. Ouargla
- C. Singh, et J. Lin. (2008). « Isolation and Characterization of Engine Oil Degrading Indigenous Microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa ». *African Journal of Biotechnology* 7 (12): 1927-1932.
- Canny G. (2002). Bioremediation of diesel contaminated soils: An investigation into the effects of biosurfactant and organic matter amendments. Thèse Doctorat, Institute of Technology, Sligo-Irlande.
- Cappuccino J. G. et Chad T.W. (2017). *Microbiology: A Laboratory Manual, Global Edition*. Pearson Education Limited.
- Chamy R., et Rosenkranz F. (2013). *Biodegradation: Engineering and Technology*. éd. InTechOpen.

- Chen J., Huang P.T., Zhang K.Y. et Ding F.R. (2012). Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. *J Appl Microbiol.* 112 (4): 660-671.
- Cheremisino N. P. (2002). *Handbook Of Water And Wastewater Treatment Technologies*. Edition Butterworth-Heinemann.
- Committee on In Situ Bioremediation, et Commission on Engineering and Technical Systems. (1993). *In Situ Bioremediation: When Does it Work?* National Academy Press.
- Costin S., et Sorescu I. (2015). *ABIS online-bacterial identification software*.http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html, database version [March 25, 2017].
- Dahalan SF., Yunus I., Johari WL., Shukor MY., Halmi MI., Shamaan NA., et Syed MA. (2014). Growth kinetics of a diesel-degrading bacterial strain from petroleum-contaminated soil. *Journal of Environmental Biology* 36: 399-406.
- Das N. et Chandran P. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International* 13. doi:10.4061/2011/941810.
- Delarras C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Edition Lavoisier.
- Dion P., et Nautiyal C. S. (2008). *Microbiology of Extreme Soils*. Edition Springer.
- Djerbaoui A. N. (2011). Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi Messaoud contaminés par les hydrocarbures. Thèse Magister, Université KasdiMerbah, Ouargla.
- Dommergues YR, et Mangenot, F. (1970). *Ecologie microbienne du sol*. Edition Masson et Cie.
- Dufresne M. (2013). LES TECHNOLOGIES DE TRAITEMENT DES SOLS CONTAMINÉS : LESQUELLES SONT DURABLES. Thèse Master, Université de Sherbrooke, Canada.
- Enamul H. M., et Al-Majed A. A. (2015). *Fundamentals of Sustainable Drilling Engineering*. 1^{re} éd. Edition Wiley-Scrivener.
- Erika M. T., et Károly M. (2013). Practical Microbiology. In .Eötvös Loránd University.
- Evans M.E., et Heller F. (2003). *Environmental Magnetism Principles and Applications of Enviromagnetics*. Edition Academic Press.
- Fakruddin Md. (2012). Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* 3 (4): 1-6. doi:10.4172/2157-7463.1000124.
- Fox R. D. (1996). Physical/Chemical Treatment of Organically Contaminated Soils and Sediments. *Journal of the Air & Waste Management Association* 46 (10): 993-1003, DOI: 10.1080/10473289.1996.10467536
- Francisco E., Zille A., Dias G. F., Ragagnin M. C., Durrant L. R., et Cavaco-Paulo A. (2009).

- Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (3): 280–288.
- GABET S. (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse Doctorat, Université de Limoges, France.
- Gaudu F. (2014). Bioremediation des sols pollués aux hydrocarbures. Thèse Master 2, Université de Rennes 1, France.
- Gbadebo M. A., Taiwo M. A., et Eughele U. (2010). Environmental aspect of oil and water-based drilling muds and cuttings from Dibi and Ewan off-shore wells in the Niger Delta, Nigeria. *African Journal of Environmental Science and Technology* 4 (5): 284–292.
- Gözde O. (2015). Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters. Thèse Master, Middle East Technical University, Ankara, Turquie.
- Gruyer N., et Groleau PE. (2015). Hydrocarbures pétroliers caractéristiques, devenir et criminalistique environnementale. *Centre d'expertise en analyse environnementale*. Québec
- Guermouche M. A. (2014). Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse Doctorat, Université d'Oran, Oran.
- Hadj Abbas A. (2011). Les bourbiers des forages pétroliers et des unités de production: Impact sur l'environnement et technique de traitement. Thèse Magister, Université KasdiMerbah, Ouargla
- Halmi M.I.E, Shukor M.S, Johari W.L.W, et Shukor M.Y. (2014). Modeling the growth curves of *Acinetobacter* sp. strain DRY12 grown on diesel. *JEBAT* 2 (1): 33-37.
- Hassan K. F., et Jasim S. F. (2016). Occurrence Of Bacteria In Some Contaminated Soil By Diesel Fuel In Baghdad-Iraq. *International Journal Of Scientific & Technology Research* 5 (5): 41–44.
- Hassanshahian M., et Cappello S. (2013). Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments. In *Biodegradation - Engineering and Technology*, 101–135. InTechOpen.
- Hatzikioseyan A. (2010). Chapter 3 Principles of bioremediation processes. *Trends in Bioremediation and Phytoremediation*. 23-54. Editors: Grazyna Plaza. ISBN:978-81-308-0424-8.
- Heinrich D., et Hergt M. (1993). *Atlas de l'écologie. Le livre de poche, encyclopédies d'aujourd'hui*. Edition Eyrolles.
- Igwo-Ezikpe MN, Okpuzor J., Awodele O., Nwaokorie FO, Fowora MA, et Akinbo MO. (2010).

- Prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria in contaminated tropical soil in Lagos, Nigeria: involvement of plasmid in degradation. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 4 (6): 2133-2145.
- Jagadevan S., et Mukherji S. (2003). Successful in situ oil bioremediation programmes – Key parameters. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 495-501.
- Jaysree R.C. (2015). Comparative study of biosurfactant producing bacteria. Thèse Doctorat, Vellore Institute of Technology, India.
- Jeanno R., Lemièrre B., et Chiron S. (2000). Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. RP-50120-FR. Bureau de recherches géologiques et minières, France.
- Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, et Christopher J. Woolverton. (2009). Prescott's Principles of MICROBIOLOGY. Edition McGraw-Hill, P 140.
- Kafilzadeh F. et Mokhtari S. (2013). Isolation and Identification of Phenol Degrading Bacteria from Mangrove Sediments in the Persian Gulf (Asaluyeh) and their Growth Kinetics Assay. *Biomedical and Pharmacology Journal* 6 (2): 189-196.
- Kaushish L. M., Ashutosh B., Kumar B. K., et Koushalya D. (2012). The study of growth kinetics of *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447) using diesel as the sole carbon and energy source. *International journal of environmental sciences* 3 (1): 20-27
- Kedidi A. (2014). Effets de salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence du gasoil. Thèse Master, Université KasdiMerbah, Ouargla.
- KEMP D. (1998). *The Environment Dictionary*. Edition Routledge.
- Khelil F, Matallah-Boutiba A, Chemlal-Kherraz D, et Boutiba Z. (2014). Characterization of hydrocarbonoclastes bacteria isolated from marine waters west Algeria: evolution analysis in presence of crude oil ». *Journal of current research in science* 2 (5): 557-563.
- KHODJA M. (2008). Les fluides de forage: Etude des performances et considérations environnementales. Thèse Doctorat, Institut National Polytechnique Toulouse, France.
- Kleyn J., et Bicknell M. (2003). *Microbiology Experiments a Health Science Perspective | Angular Resolution | Lens (Optics)*. Edition The McGraw-Hill Companies.
- Kothari V., Panchal M., et Srivastava N. (2014). Microbial Degradation of Hydrocarbons. *National Journal*, Institute of Science, Nirma University India
- Kulkarni S. V. (2014). BIOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBON POLLUTED SITES FOR THE CONSERVATION OF SOIL MICROBIAL DIVERSITY. Thèse doctorat, University Of Pune, India.
- Lecomte T. (1995). *Gestion écologique par le pâturage: l'expérience des réserves naturelles*.

- Réserves Naturelles de France.
- Leyral G., et Joffin JN. (1998). *MICROBIOLOGIE TECHNIQUE 2 Documentation technique*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
- Mahendra, B. G., B. SanthaveeranaGoud, et G. M. Srinidhi. (2010). Influence of moisture content and oxygen concentration on biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Journal of Environmental Research And Development* 4 (4): 947-957
- Mandri T., et Lin J. (2007). Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology* 6 (1): 023-027.
- Milcent R. (2007). *Chimie organique Stéréochimie, entités réactives et réactions*. Edition EDP Sciences.
- Mnif I., Sahnoun R., Ellouze-Chaabouni S., et Ghribi D. (2013). Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants' potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (2): 851-861.
- Monod J, C. (1999). Nature sauvage, nature sauvée : Ecologie et peuples autochtones. *Ethnies* 13 (24-25): 236.
- Morello J. A., Granato P. A., et Mizer H. E. (2003). *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology*. 7^{ème} édi. Edition The McGraw-Hill Companies.
- Mouafi F. E., Abo Elsoud M. M., et Moharam M. E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnol Rep (Amst)*. 8;(9):31-37. doi: 10.1016/j.btre.2015.12.003.
- Mougin C., Chaplain V. et Gaillardon P. (1996). le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques l'intérêt des champignons filamenteux. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 28: 49-56.
- Mumtaz M., et George J. (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Nguyen JP. (1993). *Le Forage*. Editions OPHRYS.
- Nisha P., Mageo MG., et Bisi K. P. (2016). biosurfactant production and diesel degradation by bacterial consortium isolated from crude oil polluted soil. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences* 6 (3): 326-331.
- Nkem BM., Halimoon N., Yusoff FM., Johari WL., Zakaria MP., Medipally SR., et Kannan N. (2016). Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach. *Malaysia. Mar Pollut Bull*. 107 (1): 261-268.

- O'Leary W. M. (1989). *Practical Handbook of Microbiology*. Edition CRC Press.
- Pacwa-Płociniczak M, Grażyna A. P., Zofia PS, et Swaranjit S. C. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12 (1): 633-654. doi:10.3390/ijms12010633.
- Palanisamy N. , Jayaprakash R., Srilakshman K., Vasanthi N. S., Preethy C., et Sudheer K. (2014). Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 12 (142).doi:10.1186/s40201-014-0142-2.
- Pérez-Armendáriz B., Mauricio-Gutiérrez A., Jiménez-Salgado T., Tapia-Hernández A. et Santiesteban-López A. (2013). Emulsification of Hydrocarbons Using Biosurfactant Producing Strains Isolated from Contaminated Soil in Puebla, Mexico. In *Biodegradation - Engineering and Technology*, 26-45. InTechOpen.
- Prakash A., Bisht S. et Singh J. (2014). Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences* 38 (1): 41-50.
- Prescott LM., Harley J., et Klein DA. (2003). *Microbiologie*. Edition De Boeck.
- Prescott, Lansing M., Linda M. Sherwood, et Christopher J. Woolverton. (2010). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- Priya T., et Usharani G. (2009). Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International* 2 (4): 284-287.
- Pulgarin A. (2012). Méthodes pour la datation des hydrocarbures déversés dans l'environnement. Thèse Master, Université de Sherbrooke. Canada:
- R I C H A R D J. LEWIS, ELIZABETH K A B A C K, et T E R R Y A. K R U L W I C H. (1981). Pleiotropic Properties of Mutations to Non-alkalophilin *Bacillus calcalophilus*. *Microbiology* 128(2):427-430 DOI: 10.1099/00221287-128-2-427
- Reddy K. R., et Cameselle C. (2009). *Electrochemical remediation technologies for polluted soils, sediments and groundwater*. Edition John Wiley & Sons, Inc.
- Remouche K. (2008). trois milliards de dollars d'investissement injectés annuellement. *Libèrtie*. <http://www.liberte-algerie.com/entretien/3-milliards-de-dollars-dinvestissement-injectes-annuellement-75004>
- Reshmi G., et Divya C.V. (2014). The pattern of degradation of diesel by *Acinetobacter* species from diesel oil contaminated soil. *Scrutiny International Research Journal of Microbiology and Bio Technology* 1 (5): 16-23.
- Roberts E. R. (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and*

- Chemical Processes*. CRC Press.
- Rodríguez-Rodríguez C. E., Zúñiga-Chacón C. et Barboza-Solano C. (2012). Evaluation of growth in diesel fuel and surfactants production ability by bacteria isolated from fuels in Costa Rica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 32: 116-120.
- Selmoun M., et Benkhebeche D. E. (2016). Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants. Thèse Master, Université des Frères Mentouri, Constantine.
- Sihag S., Pathak H., et Jaroli D.P. (2014). Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons. *International journal of pure & applied bioscience*, 2 (3): 185-202.
- Smith P. G., et Scott J. S. (2005). *Dictionary of Water and Waste Management*. Edition iwa publishing.
- SOBRINHO H. B.S., LUNA J. M., RUFINO R. D., PORTO A. L. F., et SARUBBO L. A. (2014). Biosurfactants: Classification, Properties and Environmental Applications. *Biotechnology* 11: 1-29.
- Soltani M. (2014). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse Doctorat, Université pierre et marie curie, paris, France.
- Sonam S., Vijay K., et Ram B. T. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1 (2): 90-95.
- SOUSSA A. (2011). ETUDE DES INSTABILITES DANS UNE TIGE DE FORAGE PETROLIER INFLUENCE DU FROTTEMENT VISQUEUX. Thèse Magister, Université El-Hadj Lakhdar, Batna.
- Souza, Olivier de. (2016). « la Sonatrach va élargir la taille de son programme de forages ». *afrique expansion*. [Http://www.afriqueexpansion.com/affaires2/3871-algerie-en-2017-la-sonatrach-va-elargir-la-taille-de-son-programme-de-forages.html](http://www.afriqueexpansion.com/affaires2/3871-algerie-en-2017-la-sonatrach-va-elargir-la-taille-de-son-programme-de-forages.html).
- Suthersan S.S. (2000) *Remediation Engineering Design Concepts*. éd. LEWIS PUBLISHERS.
- Tadros T. F. (2005). *Applied Surfactants Principles and Applications*. éd. Wiley.
- Uchechukwu E. E, Sylvia O. A, et Vincent I. I. (2007). Clean up of Crude Oil-Contaminated Soil. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology* 1 (2): 54-59.
- Vazquez-Duhalt R., et Quintero-Ramirez R. (2004). *Petroleum Biotechnology Developments and Perspectives*. Edition ELSEVIER.
- Winter R. B., Kwang-Mu Y., et Ensley B. D. (1989). Microbial degradation of trichloroethylene,
- Yousaf S. (2011). The ecology of alkane-degrading bacteria in phytoremediation of diesel

fuel.Thèsedoctorat, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna.

Zhongyun Ma, B. Eng. (1998). BIOREMEDIATIONOF PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINATED SOIL USING INDIGENOUS CULCULTURES. Thèse Master of Engineering, Memorial University of Newfoundland, Canada.

Annexe

Milieux de culture Bushnell-Haas (ATLAS, 2005)

Composition :

Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄).....	1.0g
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄).....	1.0g
Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃).....	1.0g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O).....	0.2g
Chlorure de fer (FeCl ₃)	0.05g
Chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.02g

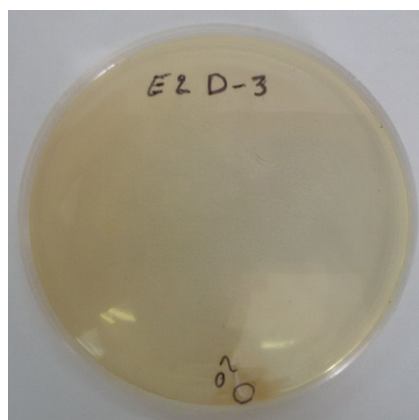
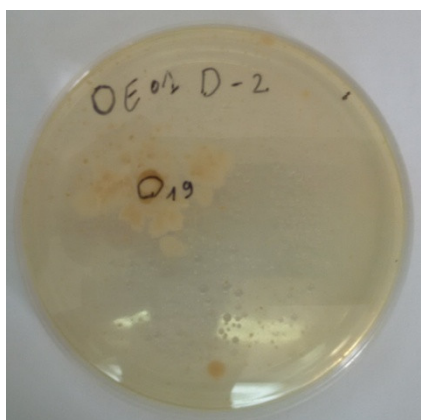
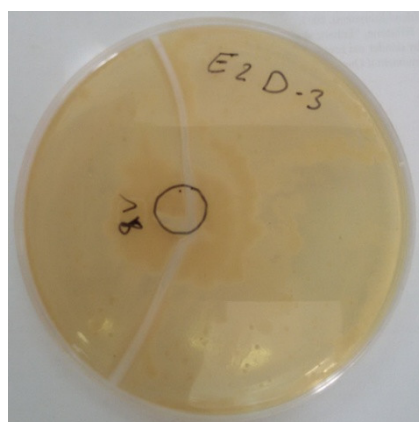
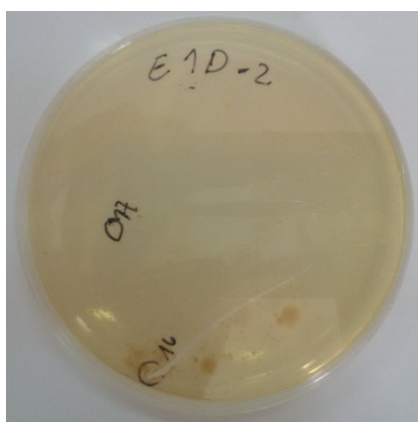
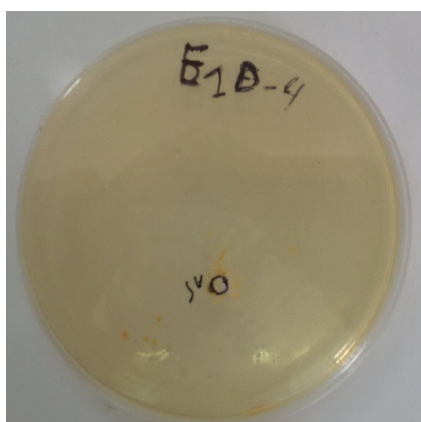
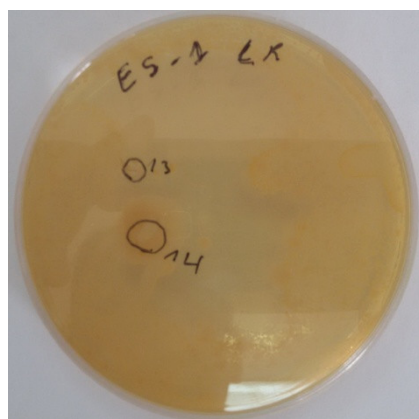
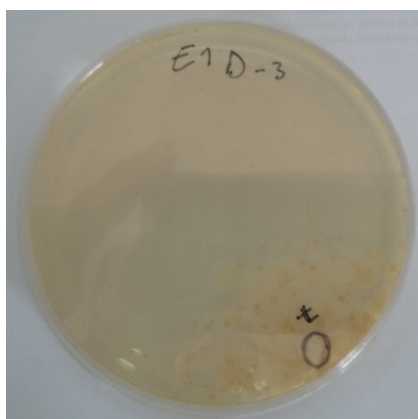
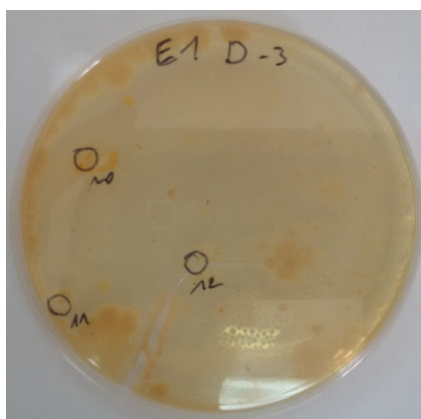
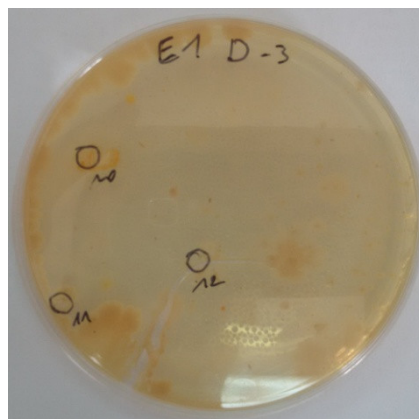
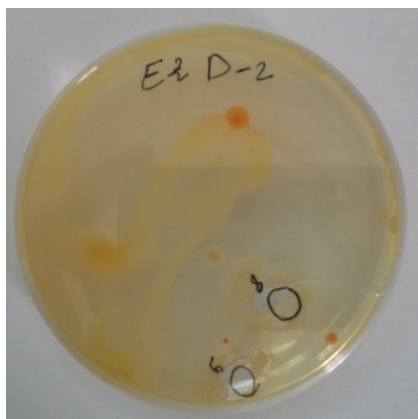
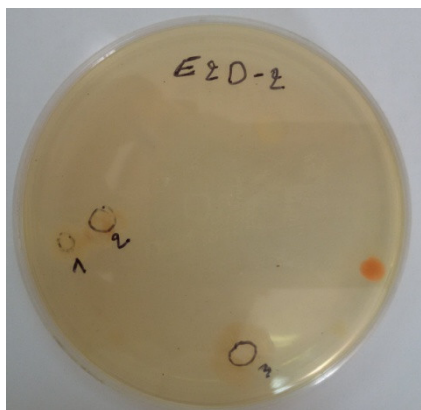
Préparation du milieu:

L'huile (hydrocarbure) filtré et stérilisé et ajouté de manière aseptique 10,0 ml d'huile stérile à 990,0 ml de Bushnell-Haas stérile refroidi. Mettre le mélange dans un récipient de mélangeur stérile. Mélanger à faible vitesse pour minimiser l'incorporation d'air dans le milieu.

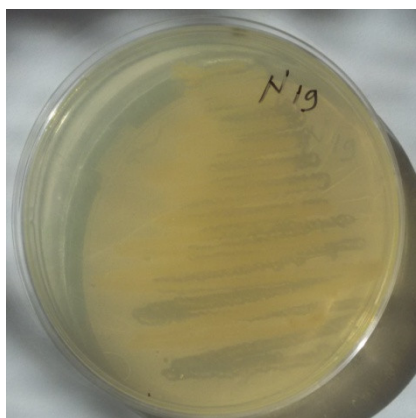
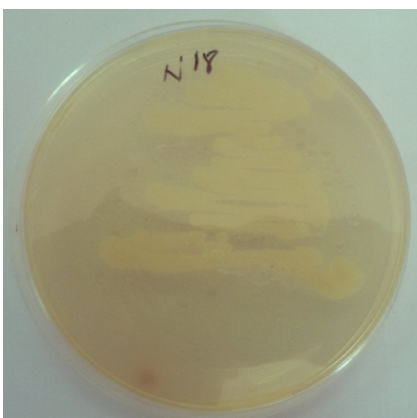
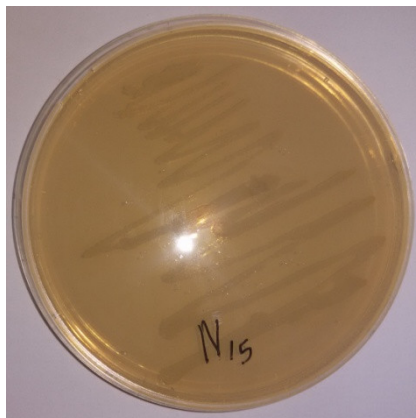
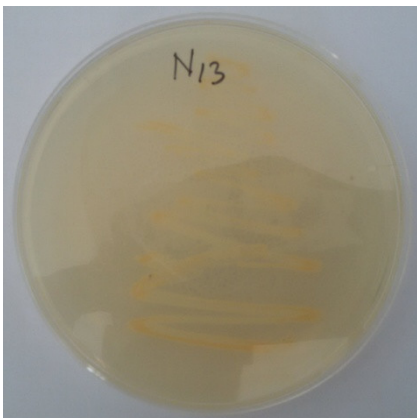
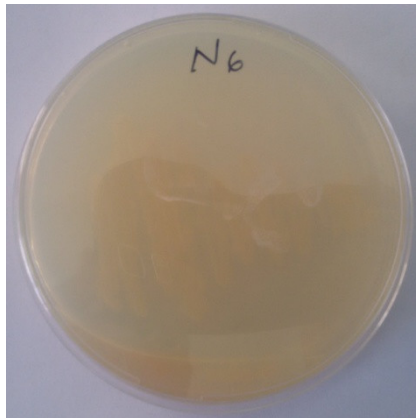
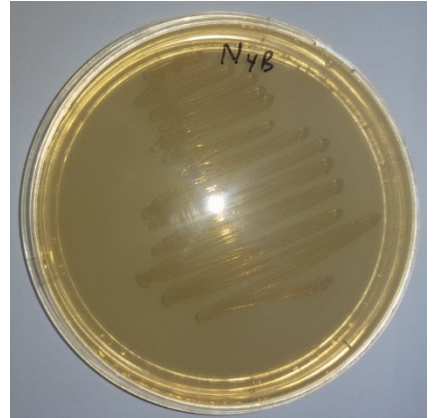
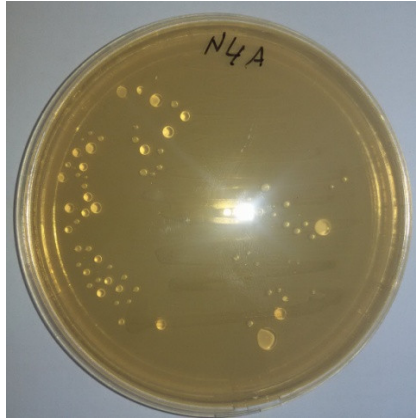
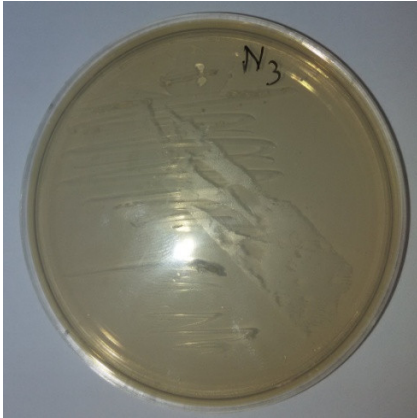
Utilisation:

Pour la culture et l'énumération des bactéries hydrocarbonoclastes .

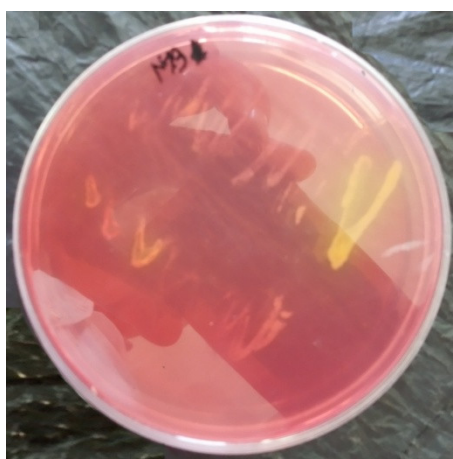
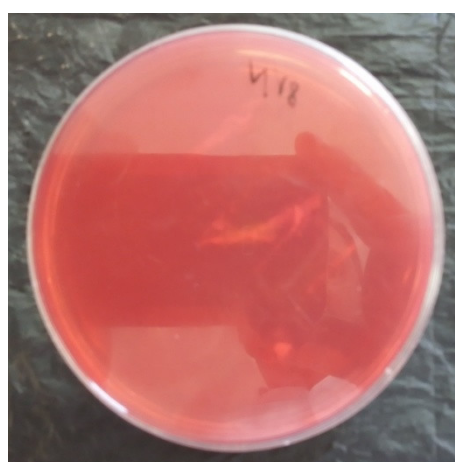
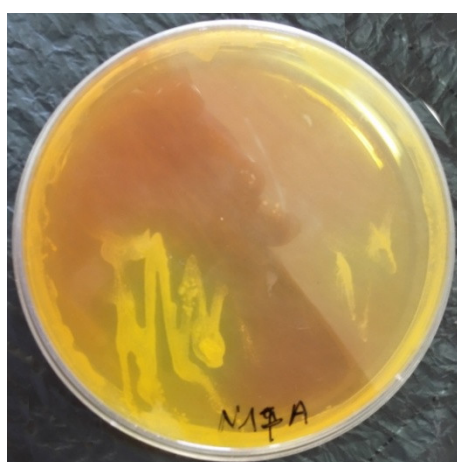
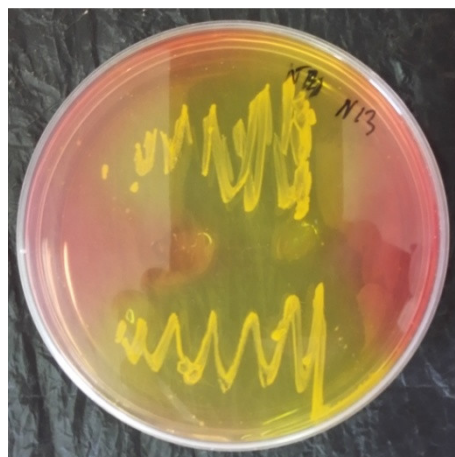
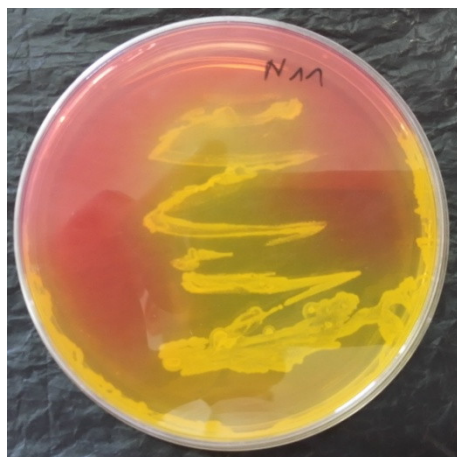
Résultats de isollements des souches



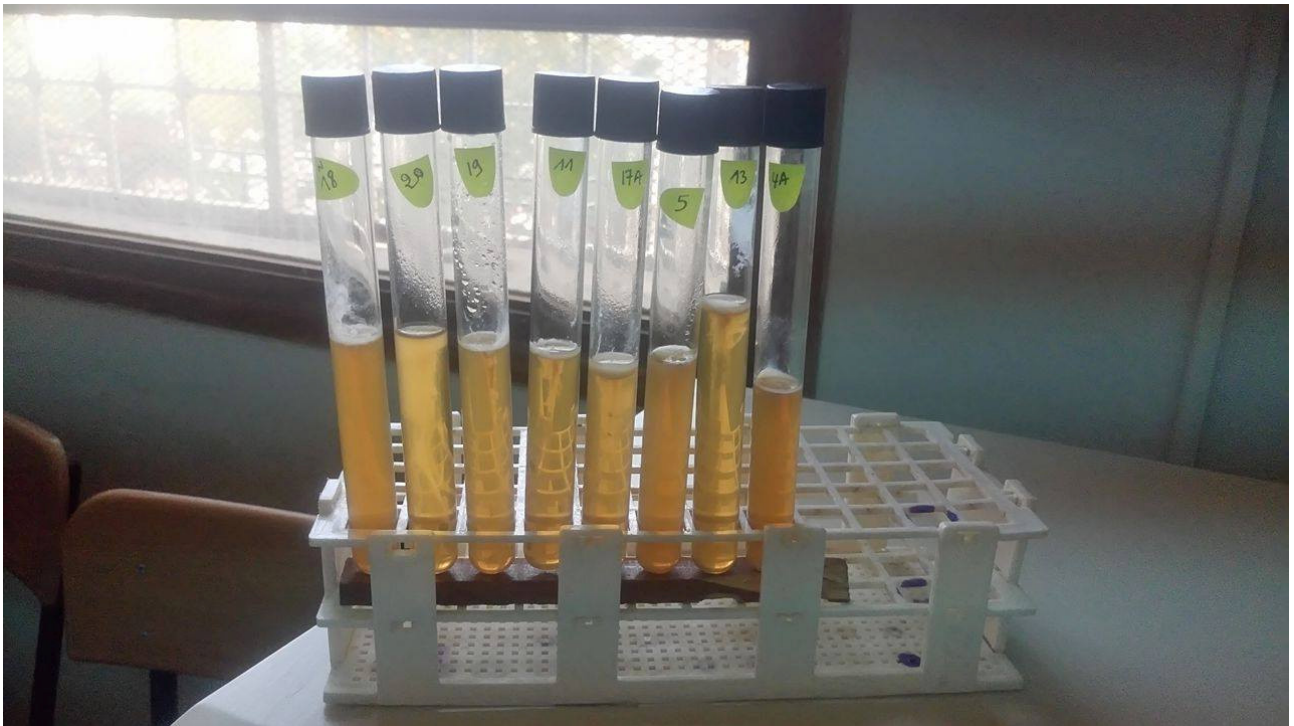
Résultats de purification des souches



Culture des souche N11, N13, N17a, N18 et N18 sur milieu Chapman



Résultats de culture du milieu Viande-Foie



Procédure d'utilisation de la galerie API 20 NE

REF 20 050

07615 J - FR - 2006/02

api® 20 NE

IVD

Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 25 tests)

- 25 galeries API 20 NE
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API AUX Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION

Galerie

La composition de la galerie API 20 NE est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

Milieu

API AUX Medium	Sulfate d'ammonium	2 g
7 ml	Agar	1,5 g
	Solution de vitamines	10,5 ml
	Solution d'oligo-éléments	10 ml
	Phosphate monosodique	6,24 g
	Chlorure de potassium	1,5 g
	Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
	pH final :	7,0-7,2

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs

- API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Réf. 20 070)
- Réactifs : JAMES (Réf. 70 542)
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635*)
* référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) point 0,5
- Catalogue Analytique API 20 NE (Réf. 20 090) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

Matériel

- Pipettes ou PSipettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI/NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - Révision en vigueur*". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, ...
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :

- Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
- Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
- Bien enfoncer le bouchon.



* Modèle 1 :

- Recouvrir la partie inclinée du bouchon avec la première phalange du pouce.
- Exercer une pression avec le pouce à la base de la partie inclinée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.



* Modèle 2 :

- Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
- Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
- Enlever délicatement le bouchon.

- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté (ex. gélose Trypcase Soja) selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Test Oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

Sélection des colonies

API 20 NE doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.

NOTE 1 : certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

NOTE 2 : Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrive la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0,85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSpipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs. Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après inoculation.

Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPNG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSpipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPNG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

Test NO₃ :

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une couleur **rouge** indique une réaction **positive**, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction **négative** peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une cupule restée **incolor**e indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient **rose-rouge**, la réaction est **négative** car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive.

La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

Test TRP :

- Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive**.

• Tests d'assimilation :

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction **positive**.

Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées \pm ou \pm .

Une fois cette lecture effectuée, l'identification doit être pratiquée comme indiqué au paragraphe "Interprétation".

Une réincubation est nécessaire dans les cas suivants :

- faible discrimination ;
- profil inacceptable ou profil douteux ;
- si la note suivante est indiquée pour le profil obtenu :

IDENTIFICATION NON VALIDE
AVANT 48 H D'INCUBATION

Alors, éliminer, à l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, les réactifs NIT 1, NIT 2 et JAMES par aspiration, recouvrir immédiatement les tests NO₃ et TRP d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe, incuber à nouveau à 29°C ± 2°C puis lire 24 h plus tard, sauf les trois premiers tests : NO₃, TRP, GLU qui doivent être lus uniquement à 24 h.

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

• Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^e test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

• Identification :

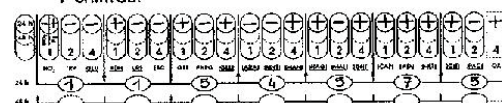
Elle est réalisée à partir de la base de données (V7.0)

* à l'aide du Catalogue Analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

* à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.



1 154 575 *Pseudomonas aeruginosa*

CONTROLE DE QUALITE

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche

1. *Shingobacterium multivorum* ATCC® 35656 de préférence ou l'une des souches suivantes :

- | | | | |
|----------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| 2. <i>Aeromonas hydrophila</i> | ATCC 35654 | 4. <i>Alcaligenes faecalis</i> | ATCC 35655 |
| 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | | |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	LGLU	LABA	LMNE	LMAN	LNAG	LMAL	LGNT	GAP	ADI	MLI	LCI	PAC	OX
1.	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-*	-	+
3.	+	-	-	V	V	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
4.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

* Des réactions faiblement positives peuvent être observées.

Profils obtenus à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja et après 48 heures d'incubation pour les tests ADH à PAC.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API 20 NE est destiné à l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux présents dans la base de données (voir Tableau d'identification en fin de notice) et à eux seuls. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres micro-organismes ou exclure leur présence.
- Les bacilles à Gram négatif non fermentants, isolés de patients atteints de mucoviscidose, peuvent générer des profils biochimiques atypiques susceptibles d'altérer leur identification.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

5728 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 92,53 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 3,13 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 4,34 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Les ampoules d'API AUX Medium non utilisées peuvent être éliminées comme déchets non dangereux.

Éliminer tous les réactifs utilisés ou non utilisés (autre que les ampoules d'API AUX Medium) ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

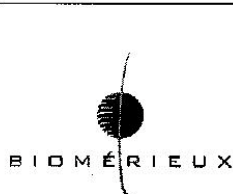
TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
				Zn / 5 min	
				rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCUline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (prolécine) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUCOSE)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABINOSE)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (MANNOSE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANNITOL)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,26	assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALTOSE)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GLUCONATE)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPRIQUE)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIPIQUE)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MALATE)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITRATE)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PHÉNYLACÉTIQUE)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale notamment peptone bovine/porcine.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV

ATCC est une marque utilisée, déposée et/ou enregistrée appartenant à American Type Culture Collection.



bioMérieux® SA
 au capital de 12 029 370 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Etoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

bioMérieux, le logo bleu, API et aplweb sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

Procédure d'utilisation de la galerie API 20 E

REF 20 100 / 20 160

07584E - FR - 2004/05

api® 20 E

IVD

Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION

Coffret de 25 tests (réf. 20 100)

- 25 galeries API 20 E
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

Coffret de 100 tests (réf. 20 160)

- 100 galeries API 20 E (4x25 galeries)
- 100 boîtes d'incubation
- 100 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture de cette notice.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs :

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402)
JAMES (Réf. 70 542)
VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 390)
- Oxydase (Réf. 55 635*)
* référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification (consulter bioMérieux)

Matériel :

- Pipettes ou PSlpettes
- Protège-ampoules
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

REACTIFS COMPLEMENTAIRES :

- API OF Medium (Réf. 50 110) :
Test pour la détermination du métabolisme fermentatif ou oxydatif du glucose.
- API M Medium (Réf. 50 120) :
Test pour la détermination de la mobilité des bactéries aéro-anaérobies.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries sont présentes dans une poche en aluminium avec sachets déshydratants.

Après ouverture de celle-ci (*), conserver les galeries restantes avec les déshydratants en refermant la poche à l'aide de la barrette de fermeture (présente dans le coffret) : placer l'extrémité de la poche entre les deux pièces de la barrette et les clamer soigneusement, à fond, sur toute leur longueur. Les galeries peuvent ainsi être conservées **10 mois après ouverture de la poche**, à 2-8°C (ou jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage, si celle-ci est antérieure).

(* *Recommandation pour l'ouverture de celle-ci* : couper juste en dessous de la soudure, en maintenant la poche droite, pour éviter d'endommager les sachets déshydratants.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 E ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté à la culture des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE**Test oxydase**

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

NOTE : API 20 E doit être utilisé avec des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans API NaCl 0,85 % Medium.

Inoculation de la galerie

- Remplir tubes et cupules des tests [CIT], [VP] et [GEL] avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

LECTURE ET INTERPRETATION**Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
 - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
 - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative**.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
 - Réincuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
 - Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
 - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

- Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.0)

 - * à l'aide du Catalogue Analytique :
 - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
 - * à l'aide du logiciel d'identification :
 - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :

- Réduction des nitrates en nitrites (NO₂) et en azote (N₂) : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive** (NO₂). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté **jaune** indique une réaction **positive** (N₂) à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est **orange-rouge**, la réaction est **négative**, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.
- Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.

NOTE : Pour les mêmes raisons que le test indole (se référer à la note du paragraphe "Lecture de la galerie"), le test de réduction des nitrates doit être réalisé en dernier.

- Mobilité (MOB) : Inoculer une ampoule d'API M Medium (cf notice).
- Culture sur gélose de MacConkey (McC) : Ensemencer un milieu de MacConkey (cf notice).
- Oxydation du glucose (OF-O) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).
- Fermentation du glucose (OF-F) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).

Ces tests complémentaires, mentionnés dans l'introduction (Codage des profils) du Catalogue Analytique, peuvent être utilisés pour constituer un profil à 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d'identification.



5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*

D'autres tests supplémentaires peuvent être proposés en cas de faible discrimination. Se référer au logiciel ou Catalogue Analytique.

CONTROLE DE QUALITE

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche 1. *Escherichia coli* ATCC 25922 de préférence ou l'une des souches suivantes :

- | | | | |
|--|------------|---|------------|
| 2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ATCC 51331 | 4. <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC 35859 |
| 3. <i>Enterobacter cloacae</i> | ATCC 13047 | 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> | ATCC 35667 |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂	N ₂ *
1.	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
2.	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
4.	-	-	-	+	V	+	+	+	-	-	V	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+
5.	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

- * Le stade N₂ (+) peut être observé pour la souche ATCC 13047 et la souche ATCC 25922.
- Profil obtenu après 24-48 H d'incubation pour la souche ATCC 51331, à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja + sang.
- Profils obtenus après 18-24 H d'incubation pour les autres souches, à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja + sang.
- Suspension bactérienne préparée en API NaCl 0.85 % Medium.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API 20 E est destiné à l'identification des *Enterobacteriaceae* et des bacilles à Gram négatif non fastidieux présents dans la base de données (voir Tableau d'identification en fin de notice) et à eux seuls. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Des discordances par rapport aux techniques conventionnelles peuvent être observées. Elles sont dues aux différences de principe des réactions utilisées en technique API. Des écarts de pourcentages peuvent également être observés et s'expliquent par des variations de substrat.
- Pour certaines espèces (ex. *Klebsiella* ou *Proteus*), des réactions du test glucose initialement positives peuvent parfois devenir négatives (apparition d'une coloration bleu-vert). Dans ce cas, cette réaction doit être considérée comme négative. Les pourcentages indiqués dans le Tableau d'identification prennent en compte ce genre de phénomène.
- Dans le cas d'identification à *Salmonella* ou *Shigella*, une identification sérologique doit être effectuée pour confirmer l'identification bactérienne.

- Les bacilles à Gram négatif non fermentants, isolés de patients atteints de mucoviscidose, peuvent générer des profils biochimiques atypiques susceptibles d'altérer leur identification.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

- *Enterobacteriaceae* : 5514 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
 - 92,80 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
 - 4,81 % des souches n'ont pas été identifiées.
 - 2,59 % des souches ont été mal identifiées.

- autres bacilles à Gram négatif non fastidieux :
2386 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
 - 90,32 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
 - 6,16 % des souches n'ont pas été identifiées.
 - 3,52 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-β-D-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
HzS	sodium thiosulfate	0,075	production d'HzS	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	TDA / immédiat marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incolore vert pâle / jaune	JAMES / immédiat rose
[VP]	sodium pyruvate	1,9	production d'acétolène (Voges Proskauer)	incolore	VP 1 + VP 2 / 10 min rose / rouge (5)
[GEL]	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELlbose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.

(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

TESTS COMPLEMENTAIRES

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
Réduction des nitrates tube GLU	potassium nitrate	0,078	production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min	
			réduction au stade N ₂	jaune	rouge
				Zn / 5 min	
				orange-rouge	jaune
MOB	API M Medium ou microscope		mobilité	immobile	mobile
McC	milieu de MacConkey		culture	absence	présence
OF-F OF-O	glucose (API OF Medium)		fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert vert	jaune jaune

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. IV
TABLE DES SYMBOLES	p. V



bioMérieux® SA
 au capital de 11 879 045 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Étoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

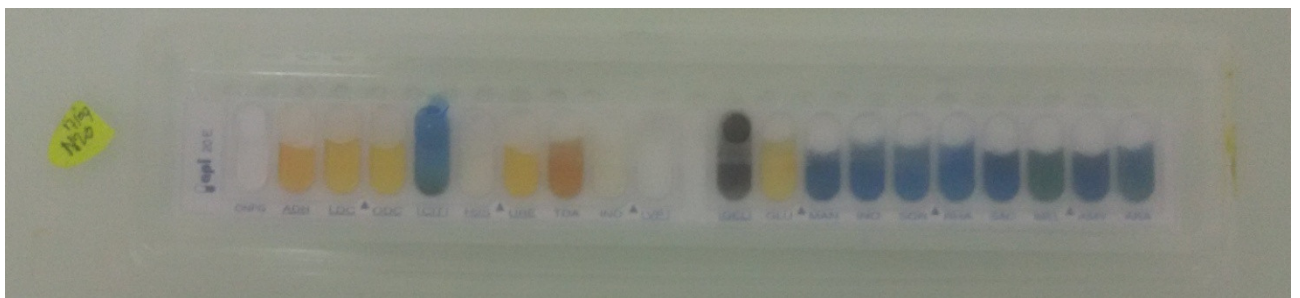
bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux SA ou de l'une de ses filiales.

Résultats d'utilisation de la galerie API 20 E



Procédure d'utilisation de la galerie API STAPH

REF 20 500

07468J - fr - 2009/04

api® Staph

IVD

Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 25 tests)

- 25 galeries API Staph
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API Staph Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION

Galerie

La composition de la galerie API Staph est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

Milieu

API Staph Medium 6 ml	Extrait de levure Bactopeptone (origine bovine/porcine) NaCl Oligoéléments Eau déminéralisée pH : 7,0 - 7,4	0,5 g 10 g 5 g 10 ml qsp 1000 ml
-----------------------------	---	--

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs

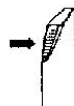
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Réactifs : VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
ZYM A (Réf. 70 494)
ZYM B (Réf. 70 493)
- McFarland Standard (Réf. 70 900)
- Catalogue Analytique API Staph (Réf. 20 500) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

Matériel

- Pipettes ou PSpipettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produitsensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Révision en vigueur*". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
 - Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
 - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
 - Bien enfoncer le bouchon.
 - Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
 - Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
 - Enlever délicatement le bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.
- Il est recommandé de réaliser un contrôle qualité avant d'utiliser chaque nouvelle ampoule de réactif ZYM B.



CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API Staph ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrive la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Réaliser une préculture sur gélose Columbia au sang (ou Agar P) 18-24 H à 36°C ± 2°C.
- Vérifier l'appartenance de la souche à la famille des *Micrococcaceae* (morphologie, Gram, catalase...), ainsi que sa pureté.
- Ouvrir une ampoule d'API Staph Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation".
- Préparer une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation de la galerie

- A l'aide d'une pipette ou d'une PSlipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemencé. Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSlipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

Après incubation, lire les réactions conformément au Tableau de Lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2.
Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.
- Test NIT : NIT 1 et NIT 2.
Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.
- Test PAL : ZYM A et ZYM B (*).
Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive.

(* Il est recommandé de contrôler chaque ampoule de réactif ZYM B avant la 1^{ère} utilisation.

Pour cela, il est recommandé d'utiliser la souche ATCC 700404 mentionnée au paragraphe Contrôle Qualité afin d'exclure tout réactif défectueux.

- Noter les résultats sur la fiche de résultats.

Test de résistance à la lysostaphine

Déterminer la résistance à la lysostaphine sur milieu Agar P selon la procédure suivante ou selon les recommandations du fabricant.

Pour cela, ensemencer par inondation la surface d'une gélose Agar P avec une suspension bactérienne d'environ 10⁷ germes/ml.

Laisser sécher 10-20 min à 36°C ± 2°C.

Déposer à la surface de la gélose, une goutte d'une solution de lysostaphine à 200 µg/ml.

Incuber 18-24 H à 35-37°C.

Une lyse totale ou subtotale de la culture bactérienne indique une sensibilité à l'enzyme.

Ce test constitue le 21^{ème} test de la galerie. Il est considéré positif en cas de résistance à la lysostaphine.

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

- Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données (V 4.1) :

- * à l'aide du Catalogue Analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

- * à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
O	GLU	TRP	PRF	MAN	LAC	PRF	MAN	XYL	NOL	IND	FAH	VP	RAF	YEL	SAC	H2O	MAN	ADH	URE	LSD
	6		7		0		6		1		1		1		3					

6 706 113 *Staphylococcus epidermidis*

CONTROLE DE QUALITE

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche

1. *Staphylococcus xylosus* ATCC® 700404 de préférence ou l'une des souches suivantes :

2. *Staphylococcus lentus* ATCC 700403 3. *Staphylococcus capitis* ATCC 35661

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
1.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	+	-	+	-	+
2.	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-
3.	-	+	+	+	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-	-*	-	-	+	-

* Ce résultat peut varier en fonction du milieu de culture utilisé.

Profils obtenus après culture des souches sur gélose au sang de mouton.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en œuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API Staph est destiné à l'identification des espèces mentionnées dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice), et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

• Microcoques/*Kocuria*

171 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 87,72 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 7,60 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 4,68 % des souches ont été mal identifiées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

- Staphylocoques
2104 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
 - 92,49 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
 - 4,42 % des souches n'ont pas été identifiées.
 - 3,09 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANNitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiToI)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites		
PAL	β-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min jaune	violet
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloro-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-αD- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-αD- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase		
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

* Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

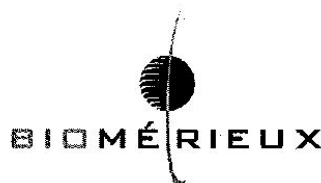
- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV

bioMérieux, le logo bleu, API et apiweb sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.

Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



 **bioMérieux SA**
 au capital de 12 029 370 €
 RCS LYON 673 620 399
 69280 Marcy-l'Etoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

Résultats d'utilisation de la galerie API STAPH



BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: [Motility-](#) [ADH+](#) [Indole-](#) [Nitrates-](#) [Esculin hydrolysis-](#) [Gelatin hydrolysis-](#) [Urease-](#) [Oxidase-](#) [Arabinose-](#)

1. *Acinetobacter baumannii* / *A. calcoaceticus* ~ 88%

Expected: [ADH-](#)

2. *Acinetobacter johnsonii* ~ 88%

Expected: [ADH-](#)

3. *Acinetobacter junii* ~ 88%

Expected: [ADH-](#)

4. *Acinetobacter rudis* ~ 88%

Expected: [ADH-](#)

Discriminatory tests suggested: [Xylose](#)

USER: redmano
DATABASE VERSION: Pseudomonas 052017-4.3.2
AUTO MODE [N]
STRAIN: N5

[Back](#) [Library](#) [Reset](#) [Print](#) [Help](#) [Exit](#)

BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: **Motility+** **NFDP-** **ADH+** **H2S-** **Indole-** **LDC-** **ODC-** **ONPG-** **Gelatin hydrolysis-** **Urease-** **Oxidase+** **Arabinose-** **Citrate+**
Glucose+ **Mannitol-**

1. *Pseudomonas mendocina* ~ 99%
Expected:

2. *Pseudomonas alcaligenes* ~ 89%
Expected: **Glucose-**

3. *Pseudomonas putida* (possibility of *P. monteilii* or *P. plecoglossicida*) ~ 89%
Expected: **Arabinose+**

4. *Pseudomonas fragi* ~ 88%
Expected: **Arabinose+**

USER: Not logged!
DATABASE VERSION: Corynebacterium 052017-5.9.3
AUTO MODE [N]
STRAIN: N11

[Back](#) [Library](#) [Reset](#) [Print](#) [Help](#) [Exit](#)

BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: **Motility-** **Catalase+** **Oxidase+** **Nitrates+** **Esculin hydrolysis+** **Gelatin hydrolysis+** **Urease-** **Beta-galactosidase-**
Arabinose- **Glucose-** **Mannitol-** **Rhamnose-** **Sucrose-**

1. *Brevibacterium avium* ~ 87%
Expected: **Esculin hydrolysis-**
2. *Brevibacterium iodinum* ~ 90%
Expected: **Esculin hydrolysis-**
3. *Brevibacterium linens* ~ 89%
Expected: **Esculin hydrolysis-**
4. *Corynebacterium pseudodiphthericum* ~ 69%
Expected: **Oxidase-** **Esculin hydrolysis-** **Gelatin hydrolysis-** **Urease+**

Discriminatory tests suggested:

USER: N17a
DATABASE VERSION: Staphylococcus 052017-4.3.4
NORMAL MODE
STRAIN: n13

[Back](#) [Library](#) [Reset](#) [Print](#) [Help](#) [Exit](#)

BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: **Aerobic+ Anaerobic+ Nitrates- VP+ ADH- Urease- Catalase+ Oxidase+ Fucose+ Glucose+ Lactose+ Maltose+ Mannitol+ Mannose+ Raffinose+ Sucrose- Trehalose+ Xylitol- Xylose+**

1. *Staphylococcus arlettae* ~ 78%
Expected: **Anaerobic- VP- Oxidase- Sucrose+**
2. *Staphylococcus gallinarum* ~ 68%
Expected: **Nitrates+ VP- Urease+ Oxidase- Sucrose+**
3. *Staphylococcus xylosus* ~ 67%
Expected: **Urease+ Oxidase- Fucose- Raffinose- Sucrose+**
4. *Staphylococcus lentus* ~ 66%
Expected: **Anaerobic- Nitrates+ VP- Sucrose+**

USER: N18
DATABASE VERSION: Bacillus 052017-4.5.3
AUTO MODE [F]

[Back](#) [Library](#) [Reset](#) [Print](#) [Help](#) [Exit](#)

BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: **Gram+** **Motility+** **Usual_media+** **ST/T spore+** **7%NaCl+** **Anaerobic+** **Esculin hydrolysis+** **Gelatin hydrolysis+** **Catalase+** **Oxidase+** **Urease+** **ADH+** **Indole-** **Nitrates+**

1. *Bacillus licheniformis* ~ 97%
Expected:
2. *Paenibacillus glucanolyticus* ~ 84%
Expected: **Urease-** **ADH-**
3. *Paenibacillus macerans* ~ 78%
Expected: **7%NaCl-** **Urease-** **ADH-**
4. *Bacillus filicolonicus* ~ 99%
Expected:

USER: N18
DATABASE VERSION: Corynebacterium 052017-5.9.3
AUTO MODE [N]
STRAIN: N19

[Back](#) [Library](#) [Reset](#) [Print](#) [Help](#) [Exit](#)

BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: [Motility-](#) [Catalase+](#) [Oxidase+](#) [Gelatin hydrolysis+](#) [Arabinose-](#) [Glucose-](#) [Mannitol-](#) [Rhamnose-](#) [Sucrose-](#)

1. *Brevibacterium iodinum* ~ 99%
Expected:

2. *Brevibacterium linens* ~ 98%
Expected:

3. *Brevibacterium avium* ~ 93%
Expected:

4. *Corynebacterium pseudodiphthericum* ~ 77%
Expected: [Oxidase-](#) [Gelatin hydrolysis-](#)

Discriminatory tests suggested: [Hippurate hydrolysis](#)

USER: redmano
DATABASE VERSION: Pseudomonas 052017-4.3.2
AUTO MODE [N]
STRAIN: N20

[Back](#) [Library](#) [Reset](#) [Print](#) [Help](#) [Exit](#)

BIOCHEMICAL DETAILS

Used tests: **Motility-** **NFDP-** **ADH-** **H2S-** **Indole-** **LDC-** **ODC-** **ONPG-** **Gelatin hydrolysis+** **Urease-** **Oxidase+** **Arabinose-** **Citrate+** **Glucose+** **Mannitol-**

1. *Acinetobacter haemolyticus* (*A. venetianus*, *A. beijerinckii* or *A. gyllenbergii*) ~ 87%
Expected: **Oxidase-**

2. *Moraxella bovis* (possibility of *M. equi* or *M. boevei*) ~ 86%
Expected: **Citrate-** **Glucose-**

3. *Moraxella pluranimalium* ~ 86%
Expected: **Gelatin hydrolysis-** **Citrate-**

4. *Acinetobacter baumannii* / *A. calcoaceticus* ~ 85%
Expected: **Gelatin hydrolysis-** **Oxidase-**

Discriminatory tests suggested: **41°C MacConkey**